

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER THREONYL-tRNA-SYNTHETASE AUS ZWEI E. COLI K12
BORRELIDIN RESISTENTEN MUTANTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität zu Berlin

vorgelegt von

Wilfried Paetz
aus Magdeburg

1971

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER THREONYL-tRNA-SYNTHEASE AUS ZWEI E. COLI K12
BORRELIDIN RESISTENTEN MUTANTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität zu Berlin

vorgelegt von

Wilfried Paetz
aus Magdeburg

1971



Referent: Professor Lochmann

Korreferent: Professor Wittmann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 11. 1971

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1.	Die Rolle der Aminoacyl-tRNA-synthetase in der Proteinbiosynthese	1
1.2.	Beteiligung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen an der Zellwandsynthese	3
1.3.	Regulation der Bildung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen	3
1.4.	Die Beteiligung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen an der Regulation der Bildung von den zugehörigen Aminosäure-biosynthetischen Enzymen	4
1.5.	Wirkungsweise des Borrelidins und Ziel der Arbeit	5

2. Material und Methoden

2.1.	Material	7
2.1.1.	Chemikalien	7
2.1.2.	Bakterienstämme	7
2.2.	Methoden	7
2.2.1.	Zellwachstum	7
2.2.2.	Puffer, verwendet bei der Herstellung von Rohextrakt und der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase	8
2.2.3.	Präparation von Rohextrakt aus Zellen, die in Minimal-medium gewachsen sind	8
2.2.4.	Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase	9
2.2.5.	Konzentrierungsmethoden	11
2.2.6.	Stabilisierung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Glycerol	11
2.2.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration	12
2.2.8.	Bestimmung der Aktivität von Aminoacyl-tRNA-synthetasen	12
2.2.9.	Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase	13
2.2.10.	Herstellung von Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum	13
2.2.11.	Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch das Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum	14

3. Ergebnisse

3.1.	Wachstum von E.coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3	15
3.2.	Threonyl-tRNA-synthetase-Aktivität in E.coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3	15
3.3.	Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E.coli A 19 K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3	21

	Seite
3.4. Untersuchung der Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität	27
3.5.1. Bestimmung von Enzymkonstanten der Threonyl-tRNA-synthetase	39
3.5.2. Untersuchung der Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Borrelidin	44
3.6. Untersuchung der Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase	46
3.7. Immunologische Charakterisierung der Threonyl-tRNA-synthetase	52
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung	67
Literatur	69
Verzeichnis der Abkürzungen	73
Lebenslauf	74

1. Einleitung

1.1 Die Rolle der Aminoacyl-tRNA-synthetasen in der Proteinbiosynthese

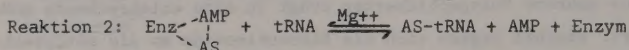
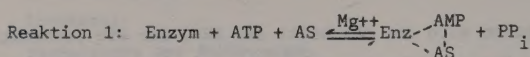
Die molekularen Vorgänge bei der Proteinbiosynthese sind heute weitgehend bekannt (s. Nirenberg 1970). Diese Erkenntnisse wurden vorwiegend durch Untersuchungen der Proteinbiosynthese bei Bakterien gewonnen; doch scheint die Proteinbiosynthese bei komplizierteren Organismen, wie Hefezellen oder in Zellen von Vielzellern nach ähnlichen Prinzipien abzulaufen. Der Prozess der Proteinbiosynthese läßt sich in drei Schritte unterteilen: Transkription, Translation und Aminoacylierung der tRNA.

Während der Transkription wird der Abschnitt der DNA, der die Information für eine oder mehrere Polypeptidketten trägt in eine entsprechende mRNA transkribiert. Hierbei lagern sich die Ribonukleotide an die entsprechenden, basenkomplementären Desoxyribonukleotide der DNA und werden dann enzymatisch durch die RNA-polymerase zur mRNA verknüpft. Die Struktur und Funktion dieser DNA-abhängigen RNA-polymerase wurde in den letzten Jahren eingehend charakterisiert (Burgess u. Travers, 1969; Seifert et. al. 1969).

Während der Translation wird dann die Nukleotidfolge der mRNA in die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette übersetzt. Hierbei binden sich Ribosomen an die mRNA und die mit Aminosäure beladene tRNA bindet sich über die Basenpaarung des Anticodons an das zugehörige Codon (Trinukleotid) der mRNA. Auch der schon gebildete Peptidkettenteil ist über die Peptidyl-tRNA mittels Basenpaarung an die mRNA gebunden. Nicht weiter erwähnt werden die für die Translation notwendigen Initiations-, Transfer-, Elongations- oder Terminationsfaktoren, oder der Aufbau der Ribosomen aus verschiedenen Proteinen und ribosomaler RNA und die Funktion der einzelnen ribosomalen Bausteine. (s. Cold Spring Harbor Symp. Vol. XXXIV, 1969).

Für die folgenden Untersuchungen interessiert vorwiegend der dritte Schritt der Proteinbiosynthese: die enzymatische Beladung der tRNA mit Aminosäuren. Jede der zwanzig physiologischen Aminosäuren wird durch eine zugehörige Aminoacyl-tRNA-synthetase an die entsprechenden tRNA's gebunden (s. Novelli 1967). Manche der Aminosäuren wie Leucine oder Arginin,

können an mehr als eine tRNA gebunden werden. In einfachen Einzellern, den Prokaryoten, ist aber für jede Aminosäure nur eine Aminoacyl-tRNA synthetase vorhanden, die die Bindung der Aminosäure an die verschiedenen tRNA's katalysiert. In komplizierteren Organismen werden für eine Aminosäure mehrere Aminoacyl-tRNA-synthetase-aktivitäten gefunden. Eine nähere Analyse der ursprünglichen Befunde hat dann ergeben, daß in den Zellorganellen, wie Mitochondrien ein eigener Satz von Aminoacyl-tRNA-synthetase und tRNA, mit anderen Eigenschaften vorhanden ist (s. Küntzel 1971). Die Aminoacylierung der tRNA läßt sich in zwei Reaktionen aufschlüsseln



Ob diese beiden Reaktionen in vivo getrennt ablaufen oder ob sie nur gemeinsam stattfinden können, ist noch umstritten (Loftfield u. Eigner, 1968; Berry u. Grunberg-Manago 1970; Rouget u. Chapeville 1968). In vitro lassen sich die beiden Teilreaktionen durch geeignete Methoden getrennt voneinander untersuchen (s. Novelli 1967). Dabei hat sich ergeben, daß die Spezifität der Aminoacyl-tRNA-synthetasen im ersten Teilschritt geringer ist als in der Aminoacylierung der tRNA: so wird durch die Isoleucyl-tRNA-synthetase auch die Entstehung von Valin- und Threonon-adenylate katalysiert; die Anwesenheit von Isoleucin-spezifischer tRNA verhindert jedoch die Bildung dieser Verbindungen (Baldwin u. Berg 1966; Loftfield u. Eigner 1966; Yaniv u. Gros 1969). Diese Wirkung der tRNA auf die Isoleucyl-tRNA-synthetase erklärt auch, daß die Beladung einer tRNA mit strukturell verwandten Aminosäuren nur in 1 : 10 000 angegeben wird (Loftfield u. Eigner 1963). Für die exakte Übersetzung der mRNA in die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette ist diese ausgeprägte Spezifität der Aminoacyl-tRNA-synthetase unerläßlich. Denn ist die Aminosäure an die tRNA gekoppelt, dann hat sie keinen Einfluß mehr auf ihren Platz in der Polypeptidkette (Chapeville et al. 1962; K.B. Jacobson, 1966). Ihr Einbau in die Polypeptidkette wird nur noch durch die Wechselwirkung von bestimmten Strukturen der tRNA, mRNA und Ribosomen bestimmt.

Die Primärstruktur einiger tRNA-Moleküle ist inzwischen analysiert worden (s. Zachau, 1969; v.Ehrenstein 1970). Über die Tertiärstruktur von tRNA existieren noch weitgehend hypothetische Vorstellungen (Cramer et al. 1969). Auch ist noch unbekannt welche Teile der tRNA im einzelnen für die Erkennung der tRNA's durch ihre zugehörigen Aminoacyl-tRNA-synthetasen verantwortlich sind(s. Zachau 1969).

Auch die Struktur der Aminoacyl-tRNA-synthetasen wird noch intensiv erforscht (Cassio u. Waller 1971; Arndt u. Berg 1970): etliche der Aminoacyl-tRNA-synthetasen sind inzwischen in reiner Form isoliert worden und von einigen konnte nachgewiesen werden, daß sie aus Untereinheiten aufgebaut sind. Die Aminosäuresequenz ist bisher von keiner der Aminoacyl-tRNA-synthetasen bekannt.

1.2. Beteiligung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen an der Zellwandsynthese

Für die Biosynthese der kürzeren Polypeptide in der Zellwand von Bakterien werden die Prozesse der Transkription und Translation der Proteinbiosynthese nicht benötigt; jedoch sind an der Entstehung dieser Peptide einige der Aminoacyl-tRNA-synthetasen beteiligt (s. Strominger, 1969). Es sind dieselben Aminoacyl-tRNA-synthetasen, die auch die Aminoacylierung der tRNA für die ribosomenabhängige Proteinbiosynthese katalysieren. In einigen Fällen wurde jedoch gezeigt, daß nicht alle an der Zellwandsynthese beteiligten tRNA Species auch für die ribosomenabhängige Proteinsynthese verwendet werden (Bumstedt et al. 1968).

Außerdem wird von der Beteiligung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen und aminoacylierter tRNA an der Synthese von Aminoacyl-phosphatidyl-glycerol in bestimmten Bakterien berichtet (Gould et al. 1968).

1.3. Regulation der Bildung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen

Für einige der Aminoacyl-tRNA-synthetasen in E. coli wurde nachgewiesen, daß ihre Bildung durch Mechanismen der Derepression und Repression reguliert wird (Nass u. Neidhardt, 1967; Williams u. Neidhardt 1969). Über die molekulare Natur des Repressors oder Induktors für die Bildung der Aminoacyl-tRNA-synthetasen ist nichts bekannt; jedoch wird die Bildung der einzelnen Aminoacyl-tRNA-synthetasen unabhängig voneinander reguliert. Außerdem wurde gezeigt, daß die Infektion von E. coli mit dem Phagen T₄ zu einer Änderung der Funktion und Struktur der Valyl-tRNA-synthetase führt (Neidhardt 1969); zwei ineinander übergehende

Formen wurden auch für die Leucyl-tRNA-synthetase beschrieben (Rouget u. Chapeville 1970). Über die physiologische Rolle dieser veränderten Aminoacyl-tRNA-synthetasen im Zellstoffwechsel der Zellen ist nichts bekannt. Neuerdings gibt es auch experimentelle Hinweise darauf, daß die Bildung verschiedener Aminoacyl-tRNA-synthetasen für die Differenzierungsvorgänge bei Vielzellern von Bedeutung sein kann (Rennert 1969; Ceccarini u. Maggio 1969; Reger et al. 1970).

1.4. Die Beteiligung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen an der Regulation der Bildung von den zugehörigen Aminosäure-biosynthetischen Enzymen.

Durch verschiedene biochemische Methoden konnte für einige der Aminoacyl-tRNA-synthetasen gezeigt werden, daß sie an der Regulation der Bildung der zugehörigen aminosäurebiosynthetischen Enzyme beteiligt sind. So wurde mit Hilfe des Histidin analogen α -methylhistidin gezeigt, daß die Histidyl-tRNA-synthetase beteiligt ist an der Bildung der histidin biosynthetischen Enzyme (Schlesinger u. Magasanik 1964); Versuche mit Histidyl-tRNA-synthetase mutanten, die eine veränderte Michaelis konstante für Histidin besaßen, bestätigen das Ergebnis für *E. coli* (Nass u. Neidhardt 1966; Nass 1967) und *S. typhimurium* (Roth u. Ames 1966). Die Beteiligung der Valyl-tRNA-synthetase an der Regulation der Bildung der valin-biosynthetischen Enzyme wurde mit temperatursensitiven Valyl-tRNA-synthetase Mutanten von *E. coli* nachgewiesen (Eidlic u. Neidhardt 1965; Yaniv u. Gros 1967). Ob die Tryptophanyl-tRNA-synthetase beteiligt ist an der Repression der tryptophan-biosynthetischen Enzyme ist umstritten (Kano et al. 1968). Neuste Ergebnisse lassen die Deutung zu, daß in *E. coli* die Tryptophanyl-tRNA-synthetase nicht an der Regulation der Tryptophan-biosynthese beteiligt ist (Mostella u. Yanofsky 1971), wogegen die Beteiligung dieses Enzyms an der Regulation der Tryptophan-biosynthese für *Bacillus subtilis* nachgewiesen wurde (Steinberg u. Anagnostopoulos 1971; Hoch et al. 1971). *E. coli* Mutanten mit einer veränderten Isoleucyl-tRNA-synthetase zeigten eine gestörte Regulation der Isoleucin-biosynthese; ein Beweis dafür, daß die Isoleucyl-tRNA-synthetase an der Regulation der Isoleucin-biosynthese in *E. coli* beteiligt ist (Szentirmai et al. 1968). Ein entsprechendes Ergebnis wurde an Hefezellen mit veränderter Isoleucyl-tRNA-synthetase erhalten (McLaughlin et al. 1969). Und in *Salmonella typhimurium* Mutanten mit einer mutierten Leucyl-tRNA-synthetase ist die Regulation der Leucinbiosynthese verändert (Alexander

et al. 1971). Die Beteiligung der Threonyl-tRNA-synthetase an der Regulation der Threoninbiosynthese wurde für *E. coli* (Nass et al. 1969) und Hefezellen (Nass u. Hasenbank 1970) mittels des Antibiotikums Borrelidin nachgewiesen, das die Threonyl-tRNA-synthetase dieser Organismen hemmt (Hütter et al. 1966).

Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob auch in die nicht erwähnten Aminosäurebiosynthesewege die entsprechende Aminoacyl-tRNA-synthetase regulierend eingreift.

1.5 Wirkungsweise des Borrelidins und Ziel der Arbeit

Borrelidin gehört zu den biogenen Aminosäureantagonisten (s. Nass, Poralla u. Zähler 1971). Es wurde 1949 in der Kulturflüssigkeit eines *Streptomyces*stammes entdeckt (Berger et al. 1949); seine Konstitution wurde als aglykosidisches Makrolid aufgeklärt (Keller-Schierlein 1967). Borrelidin ist ein spezifischer Antagonist des Threonins im Wachstumstest von *Bacillus Subtilis* (Poralla, 1967) und hemmt selektiv die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase in vitro von *E. coli* (Hütter et al. 1966), Hefezellen (Hütter et al. 1966), *Bacillus Subtilis* (Poralla, Zähler 1968), *Bacillus polymyxa* (Monreal u. Paulus 1970) und *Phaseolus vulgaris* (Burkhard et al. 1970). Die Wirkungsweise des Borrelidins wurde mit *E. coli* Zellen eingehender analysiert: es zeigte sich, daß die Aktivität von Threonin biosynthetischen Enzymen und der Threonindesaminase, einem Isoleucin biosynthetischen Enzym, nicht durch Borrelidin beeinflusst wird (Nass, Poralla u. Zähler 1969; Nass 1969); die Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wird durch Borrelidin irreversibel geschädigt (Nass 1969). Die selektive Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität durch Borrelidin ließ vermuten, daß Borrelidin resistente *E. coli* Mutanten eine veränderte Threonyl-tRNA-synthetase aufweisen: Von den vierzehn untersuchten Borrelidin resistenten Mutanten von *E. coli* K12 zeigten alle eine veränderte Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität (Nass, unveröffentlicht). Eine veränderte Enzymaktivität kann generell bedingt sein durch ein Enzym mit anderen Eigenschaften (Strukturgenmutanten) oder durch eine veränderte Regulation der Bildung des Enzyms (Regulationsmutanten). Vorversuche mit Rohextrakten aus den Borrelidin resistenten Mutanten ergaben, daß es sich in den meisten Fällen um eine veränderte Michaelis-konstante für Threonin bei der Threonyl-tRNA-synthetase handelte;

bei dem kleineren Teil der Mutanten ließ sich keine Veränderung der Michaeliskonstanten für Threonin, ATP oder tRNA nachweisen, wenn die Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt daraufhin untersucht wurde (Nass, unveröffentlicht); also ein Hinweis auf Regulationsmutanten. Da eine verlässliche Enzymcharakterisierung nur an gereinigten Enzymen durchgeführt werden kann, wird im folgenden die Reinigung und enzymatische und immunologische Charakterisierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12 Wildtyp, aus einer Strukturgen-mutante und aus einer Regulationsmutante der Threonyl-tRNA-synthetase beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 Material:

2.1.1. Chemikalien: die ^{14}C -markierten L-Aminosäuren stammten von New England Nuclear Corporation, die unmarkierten L-Aminosäuren von E. Merck AG., E. coli B tRNA und E. coli K12 tRNA wurden von Schwarz Bio Research bezogen, das ATP diKalium von Mann Research Lab. und das reduzierte Glutathion von E. Merck AG. DNAase I, chromatographisch gereinigt aus Rinderpankreas (2400 Kunitz Einheiten/mg Protein) war von Sigma, das Humanalbumin von den Behringwerken. Außerdem wurden verwendet: Trisma Base von Sigma, β -mercaptoäthanol von Fluka, Ammoniumsulfat, Glycerol und diKaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphate und EDTA jeweils p.a. der Firma E. Merck. Das Adjuvanz, Natriumalginate, stammte von der Firma Medical Alginates, England, die Membranfilter Typ SM 11306 von Satorius und die Visking Dialysierschläuche von Union Carbide. Als Säulenmaterialien wurden verwendet: DEAE 32 Cellulose von Whatman und Hydroxylapatit von Clarkson chemical company. Das Alcoa war ein Produkt der Aluminium Company von Arkansas.

Das Borrelidin wurde freundlicherweise von Dr. K. Poralla und Prof. Dr. H. Zähler zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Bakterienstämme: Folgende in Bezug auf die Threonyl-tRNA-synthetase Wildtypzellen von E. coli wurden verwendet: der RNAase I-freie E. coli K12-stamm A 19 (Gesteland 1965) und der E. coli K12-stamm K12B (Benzer 1955, Fangman et al. 1965). An Threonyl-tRNA-synthetase Mutanten: E. coli K12B Bor Res 2 und E. coli K12B Bor Res 3; beide Mutanten wurden als Borrelidin resistente Mutanten ohne Mutagen isoliert und besitzen eine veränderte Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität (Nass, unveröffentlicht). Für die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase wurden A 19-Zellen verwendet, die von Fallek Products, N.Y. gezüchtet wurden; außerdem K12B, K12B Bor Res 2- und K12 B Bor Res. 3 Zellen, die von Merck AG in angereichertem Medium (Minimalmedium mit 0.6 % Hefeextrakt) gezüchtet worden waren.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellwachstum

Für Vorversuche wurden Zellen von E. coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 in 300 ml Ansätzen in Minimalmedium (Fraenkel u.

Neidhardt, 1961) welches 0.2 % Ammoniumsulfat und 0.4 % Glucose enthielt, in einem Schüttelbad bei 37° wachsen gelassen. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung der Kultur in einem Zeiss Spektrophotometer (PMQ II) verfolgt bei 420 nm. Bis zu einer optischen Dichte 1,5 bei 420 nm wuchsen die Zellen exponentiell. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ist ausgedrückt durch die Wachstumskonstante k , die berechnet werden kann aus

$$k = \frac{\ln 2}{\text{Generationszeit (Std.)}}$$

Wenn die Kulturen in Anwesenheit von Borrelidin wachsen sollten, wurde zu einer exponentiell wachsenden Kultur so viel Borrelidin gegeben, daß die Endkonzentration 7 µg Borrelidin/ml Kulturflüssigkeit betrug.

2.2.2. Puffer, verwendet bei der Herstellung von Rohextrakt und der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase

Puffer A: 0,01 molar Kalium-Phosphat-puffer pH 7,3 in dem 10 % Glycerol, 10^{-4} molar EDTA und 6×10^{-3} molar Mercaptoäthanol enthalten sind.

Puffer B: 0,01 molar Kaliumphosphat-Puffer pH 7,3 mit 1×10^{-2} molar Magnesium-acetate und 4×10^{-4} molar EDTA und 6×10^{-3} molar Mercapthoethanol.

Puffer C: 0,01 molar Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,8 mit 10 % Glycerol und 6×10^{-3} molar Mercaptoäthanol.

Puffer D: 0,01 molar Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,3 mit 10 % Glycerol.

2.2.3. Präparation von Rohextrakt aus Zellen, die in Minimalmedium gewachsen sind

Alle Arbeitsgänge wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 0° bis 4° ausgeführt. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 10 min. bei 7000 rpm im GSA-Rotor). Anschließend wurden die Zellen in Puffer A resuspendiert und erneut wie beschrieben abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 3 ml Puffer A resuspendiert und zum Aufbruch der Zellen mit Ultraschall behandelt (1 Min. setting 15 mit dem Sonifyer B 12 Branson sonic power Comp.). Durch Zentrifugieren (Sorvall 30 Min. 9000 rpm in Rotor SS 34) wurden

die Zellbruchstücke von dem zellfreien Überstand getrennt. Der zellfreie Überstand wurde durch Dekantieren gewonnen und anschließend seine Proteinkonzentration und seine Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität bestimmt.

2.2.4. Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase

Alle Arbeitsgänge wurden, wenn nicht anders erwähnt bei 0° bis 4° durchgeführt. Nach dem Ammoniumsulfat-Reinigungsschritt wurde für die weitere Reinigung des Enzyms weitgehend der Methode zur Isolierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli B von Hirsh (1968) gefolgt.

a. Herstellung von ribosomenfreiem Zellextrakt

100 g der gefrorenen Zellen (E. coli A19, K12B, K12B Bor. Res 2 oder K12B Bor Res. 3) wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend bei 4° in einer Mörsermühle (RMO Retsch, Haan) mit 200 g Alcoa zusammengegeben und homogenisiert. Nach 20 Min. wurden 200 ml Puffer B dazu gegeben und dann weitere 20 Min. kontinuierlich gerührt. Alcoa und Zelldebris wurden anschließend abzentrifugiert (30 Min. 16 000 rpm Rotor SS 34, Sorvall). Zu dem zellfreien Überstand wurden 1000 Einheiten DNAase gegeben. Anschließend wurden die Ribosomen abzentrifugiert (Spinco L2 50B, Rotor 60 Ti, 3 Stunden bei 48 000 rpm). Das ribosomenhaltige Pellet wurde verworfen und der Überstand auf 10 % Glycerolgehalt gebracht. Nach Bestimmung des Proteingehaltes und der Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität wurde der ribosomenfreie Rohextrakt bei - 20° eingefroren.

b. Ammoniumsulfatfällung:

Zu dem ribosomenfreien Überstand wurde tropfenweise unter ständigem Rühren gesättigte Ammoniumsulfatlösung in Puffer A gegeben, bis der Rohextrakt auf 40%-ige Ammoniumsulfatsättigung gebracht worden war. Nach weiteren 30 Min. Rühren wurde das Präzipitat abzentrifugiert (20 Min. 10 000 rpm Sorvallzentrifuge, Rotor SS 34) und nach Abgießen des Überstandes wurde das Präzipitat in wenigen ml Puffer A gelöst und 24 Stunden gegen 5 Liter des gleichen Puffers unter dreimaligem Wechseln des Aussendialysats dialysiert. Der Überstand wurde wie für die 40 %-ige Ammoniumsulfatsättigung beschrieben anschließend in 5 %

Schritten bis auf 75 %-ige Ammoniumsulfatsättigung gebracht und die einzelnen Präzipitate wurden jeweils abzentrifugiert, aufgelöst und dialysiert wie für das 40 %-ige Präzipitat beschrieben. Die jeweils zu dem Überstand zuzugebende Menge gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde berechnet nach:

$$\frac{\text{ml zuzugebende Ammoniumsulfatlösung}}{\text{ml vorhandene Lösung}} = \frac{(S_2 - S_1)}{100 - S_2}$$

S_1 = in dem Extrakt vorhandene Ammoniumsulfatkonzentration

S_2 = in dem Extrakt gewünschte Ammoniumsulfatkonzentration

Nach der Dialyse wurde die spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase in den einzelnen Fraktionen bestimmt, die dann bei -20° eingefroren und aufbewahrt wurden.

c. DEAE-cellulose-Säulenchromatographie

Die dialysierten Ammoniumsulfatfraktionen mit der höchsten Threonyl-tRNA-synthetase spezifischen Aktivität wurden auf eine DEAE-32 säule (2 x 70 cm) aufgetragen. Die DEAE-cellulose wurde vorbehandelt und die Säule gepackt, wie bei Peterson 1970 beschrieben. Die Äquilibration der Säule mit dem Startpuffer (Puffer A) wurde durch Messung des pH und der Leitfähigkeit kontrolliert. Nach Auftragen der Threonyl-tRNA-synthetasehaltigen Fraktion wurde die Säule nochmal mit 500 ml Startpuffer gespült; anschließend wurde ein linearer Kaliumphosphatgradient angelegt (0.05 molar - 0,4 molar Kaliumphosphat) in Puffer A. Das Gradientenvolumen betrug 1000 ml/1000 ml, die Durchlaufgeschwindigkeit 55 - 70 ml/Std., es wurden Fraktionen von 16 ml gesammelt. Anschließend wurde die Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität in den Fraktionen bestimmt; die aktivsten Fraktionen wurden zusammengegeben und mit Ammoniumsulfat konzentriert auf einen Proteingehalt von ungefähr 10 mg/ml, und die spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase bestimmt.

d. Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Die konzentrierte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion des vorhergehenden Schrittes wurde auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen (Säulenmasse 1 x 30 cm). Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 0,003 molarem Puffer C gewaschen und dann auf der Säule mit 0,03 molarem Puffer C äquilibriert. Nach Auftragen der Threonyl-tRNA-synthetasefraktion wurde ein

linearer Kaliumphosphat Gradient zur Elution der Protein angelegt (0,03 - 0,4 molar Kaliumphosphat; pH und weitere Zusätze wie Puffer C). Das Gradientenvolumen betrug 300 ml/300 ml. Die Durchlaufgeschwindigkeit war 20 ml/Std., das Eluat wurde in 9 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität wurden zusammengegeben und in einem Ultravakuumpkonzentrierer (Typ SM 16305, Satorius) konzentriert auf ungefähr 3 ml mit einer Proteinkonzentration von 0,3 bis 1,5 mg/ml. Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde die konzentrierte Fraktion in 0,5 ml Portionen bei -80° eingefroren und aufbewahrt.

2.2.5 Konzentrierungsmethoden

Von mehreren ausprobierten Methoden zur Konzentrierung von Säuleneeluaten empfahlen sich zwei:

- a) Die 24-stündige Dialyse gegen 3,6 molare Ammoniumsulfatlösung in Puffer A pH 7,3 eingestellt mit Ammoniumhydroxyd; das resultierende Threonyl-tRNA-synthetase haltige Präzipitat wurde anschließend abzentrifugiert und in wenigen ml Puffer A gelöst und gegen 5 Liter von Puffer A unter mehrmaligem Wechsel des Aussendialysats 24 Std. dialysiert.
- b) Zur Einengung von einem Volumen bis zu 200 ml, in dem weniger als 50 μ g/ml Ausgangsproteinkonzentration enthalten war, eignete sich besonders das Satorius Ultrafiltrationsgerät Typ SM 16305; es wurde ein Endvolumen von ungefähr 5 ml erreicht. Bei der Verwendung beider Konzentrierungsmethoden wurde kein Aktivitätsverlust der Threonyl-tRNA-synthetase beobachtet.

2.2.6. Stabilisierung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Glycerol

Die Reinigung und Aufbewahrung der Threonyl-tRNA-synthetase war nur möglich in Anwesenheit von Mercaptoäthanol und Glycerol. Der stabilisierende Effekt von Glycerol auf Aminoacyl-tRNA-synthetasen aus *E. coli* wurde beobachtet für: Glycyl-, Prolyl-, und Seryl-tRNA-synthetase (Muench und Berg 1966), die Leucyl-tRNA-synthetase (Hayashi, et al., 1970), und die Threonyl-tRNA-synthetase (Hirsh, 1968). Die Rohextrakt-

fraktionen konnten ohne Aktivitätsverlust der Threonyl-tRNA-synthetase über mehrere Monate in Puffer A bei -20° oder -80° aufbewahrt werden; die konzentrierten, gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen ließen sich in Puffer A ebenfalls ohne Aktivitätsverlust über mehr als 5 Monate bei -80° aufbewahren.

2.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kolorimetrisch nach der Methode von Lowry et al. 1951 bestimmt, wobei Humanalbumin als Standard benutzt wurde. In den fraktionierten Säuleneluatn wurde die Proteinkonzentration verfolgt durch die Messung der Absorption der Fraktionen bei 280 nm.

2.2.8. Bestimmung der Aktivität von Aminoacyl-tRNA-synthetasen

Die Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde gemessen durch Messung der Bildung von ^{14}C -Threonyl-tRNA (Berg, et al. 1961; Fangman u. Neidhardt, 1964; Nass, 1967). Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 0,5 ml wenn nicht anders angegeben: limitierende Mengen von Threonyl-tRNA-synthetase in Puffer A, 50 μ Mole Tris (eingestellt auf pH 8,2 bei 22° mit HCl), 5 μ Mole Mg Cl_2 , 5 μ Mole KCl, 1 μ Mole GSH, 1 μ Mole diKalium-ATP, 500 μg E. coli B tRNA und 0,01 μ Mole L-Threonin (Spezifische Aktivität 10 uC/ μ Mole). Die einzelnen Reaktionspartner wurden im Eisbad zusammenpipettiert und anschließend 15 Min. bei 37° im Wasserbad inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde gestoppt durch Abkühlen der Inkubationsröhrchen in einem Eisbad und sofortige Zugabe von 3 ml eisgekühlter 7 %-iger Trichloressigsäure, die 1 mg/ml ^{12}C -Threonin enthielt. Nach weiteren 20 Min. wurde die präzipitierte tRNA der einzelnen Proben jeweils auf ein Membranfilter gegeben (Satorius, Typ SM 11306), und zweimal mit je 6 ml der Trichloressigsäurelösung gewaschen. Anschließend wurden die Filter 20 Min. unter Rotlicht getrocknet und für zweimal 10 Min. im Festproben-Zähler (Tracerlab, Lowbackground Counter) gezählt. Der Enzymtest wurde stets in Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert errechnet wurde. Die Threonyl-tRNA-synthetase-Einheit ist definiert als die Enzymmenge, die die Bildung von 1 μ Mole Threonyl-tRNA pro Std. katalysiert. Die spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase

ist ausgedrückt als Enzymeinheiten/mg Protein. Die Aktivität anderer Aminoacyl-tRNA-synthetasen wurde entsprechend der der Threonyl-tRNA-synthetase bestimmt, unter Verwendung der entsprechenden Aminosäure anstelle von Threonin, und eines Tris-puffers von pH 7,6 eingestellt bei 22°.

2.2.9. Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase

Für die Bestimmung der Hitzelabilität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde vor der Messung der enzymatischen Aktivität wie unter 2.2.8. beschrieben, aus den für den Enzymtest verdünnten Rohextrakten oder gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen aliquote Mengen verschiedene Zeiten bei verschiedenen Temperaturen (s. Ergebnisse) inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In den so vorbehandelten Proben wurde dann die Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität bestimmt, und verglichen mit der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität in entsprechenden Enzymproben, die nicht vorinkubiert worden waren; die Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität dieser nicht vorbehandelten Proben wurde als 100 % gesetzt und dementsprechend wurde die prozentuale Abnahme der Enzymaktivität in den Hitzevorbehandelten Proben berechnet, und in Abhängigkeit von der Zeit im semilogarithmischen Maßstab aufgetragen. Als Maß für die Hitzeinaktivierung wurde die Zeit genommen, in der die Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase bei einer bestimmten Temperatur auf 50 % abgenommen hatte.

2.2.10. Herstellung von Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum

Die Immunisierung erfolgte wie für die Herstellung von Anti-Phenylalanyl-tRNA-synthetase-Serum beschrieben (Fangman, et al. 1965). Als Antigen wurde gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19-Zellen verwendet, mit einer Proteinkonzentration von 1,0 mg/ml in Puffer A. Es wurde ein Kaninchen mit insgesamt 2,2 mg Protein der Threonyl-tRNA-synthetasefraktion immunisiert. Jeweils direkt vor der Injektion wurde die Enzymfraktion 1 : 1 mit dem Adjuvanz Alginate gemischt. Das Immunisierungsschema war wie folgt:

1. Woche: 1. Tag 0,200 mg Protein der Enzymfraktion
2. Tag 0,100 mg Protein der Enzymfraktion
3. Tag 0,100 mg Protein der Enzymfraktion

2. Woche: 1. Tag 0,200 mg Protein der Enzymfraktion
2. Tag 0,200 mg Protein der Enzymfraktion
3. Tag 0,300 mg Protein der Enzymfraktion
3. Woche: 1. Tag 0,200 mg Protein der Enzymfraktion
2. Tag 0,300 mg Protein der Enzymfraktion
3. Tag 0,500 mg Protein der Enzymfraktion

Das Antigen wurde jeweils zur Hälfte intrakutan in den Rücken und intramuskulär in einen der beiden Hinterläufe des Kaninchens injiziert. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurde dem Tier 10 ml Blut aus der marginalen Ohrvene unter leichtem Vakuum entnommen. Zwei Tage später wurde nochmals auf die gleiche Weise 20 ml Blut entnommen. Das Blut wurde nach der Entnahme 24 Std. bei 4° aufbewahrt; anschließend wurde durch Zentrifugation (2000 rpm Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS 34) das Serum gewonnen. Das Erythrocytenfreie serum wurde zur Entfernung der Leukozyten nochmals zentrifugiert (8000 rpm, 20 Min., Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS 34) und in kleinen Portionen bei - 20° eingefroren.

2.2.11. Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch das Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum

Der Enzymhemmungstest wurde ausgeführt in Anlehnung an Cinader 1955 und Pollock 1956, wie von Fangman et al. 1965 beschrieben. Aus dem Antiserum wurde mit Puffer D eine serologische Verdünnungsreihe hergestellt. 0,1 ml der verschiedenen Antiserumverdünnungen wurden dann zu 0,5 ml der verdünnten Enzymfraktionen gegeben und 30 Min. bei 37° im Wasserbad inkubiert. Als Kontrolle wurde 0,5 ml der jeweiligen Enzymfraktion mit 0,1 ml Antiserumfreiem Puffer D versetzt und ebenfalls 30 Min. bei 37° inkubiert. Die inkubierten Proben wurden im Eisbad abgekühlt; anschließend wurde in Doppelbestimmungen in jeweils 0,1 ml des inkubierten Gemisches die Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität bestimmt. Die sich ergebenden Enzymeinheiten wurden dann gegen die verwendete Antiserummenge im Koordinatensystem aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1. Wachstum von E. coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3

In den Abbildungen 1-3 ist das Wachstum von E. coli K12B und der beiden Borrelidin resistenten Mutanten K12B Borr. res. 2 und 3 in Abwesenheit und Anwesenheit von Borrelidin dargestellt. Die sich aus dem Wachstum der Zellen ergebenden Wachstumskonstanten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Aus den Abbildungen 1-3 und der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß die Wachstumsrate des Wildtyps K12B durch 7 µg Borrelidin/ml Wachstumsmedium auf ungefähr ein Drittel reduziert wird, wie schon bei Nass et al. 1969 beschrieben. Dagegen wird die Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Borrelidin resistenten Mutanten durch die gleiche Borrelidinmenge nur unwesentlich beeinflußt (Abb. 2 und 3, sowie Tab. 1). Es fällt auf, daß die Wachstumsgeschwindigkeit von E. coli K12B Bor Res 2 im Vergleich zu dem des Wildtyps von 60 Minuten Generationszeit auf eine Generationszeit von 90 Minuten verlangsamt ist.

3.2. Threonyl-tRNA-synthetase-Aktivität in E. coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß Borrelidin das Wachstum von E. coli K12B hemmt, weil es selektiv die Threonyl-tRNA-synthetase dieser Zellen inhibiert. (Hütter et al. 1966; Nass et al. 1969; Nass 1969). Deshalb wurde die Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität in K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 bestimmt, die in Anwesenheit von Borrelidin gewachsen waren. Tabelle 2 zeigt, daß unter den gewählten Testbedingungen, die spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetasen in den Borrelidin resistenten Zellen erhöht ist im Vergleich zu der Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität in K12B. In E. coli Bor Res 2 und E. coli K12B Bor Res 3 die in Anwesenheit von Borrelidin gewachsen sind, ist die Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität unterschiedlich verringert. Die Spezifität der Wirkung des Borrelidins auf die Threonyl-tRNA-synthetase wird unterstrichen durch die unveränderte Aktivität anderer Aminoacyl-tRNA-synthetasen in den Zellen, die in Anwesenheit von Borrelidin gewachsen sind; Tabelle 2 zeigt die spezifische Aktivität der Valyl-tRNA-synthetase in diesen Zellen.

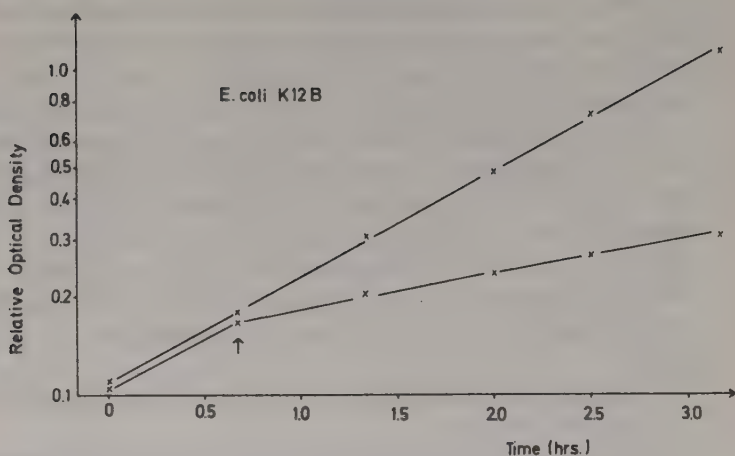


Abb.1: Wirkung von Borrelidin auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* K12B in Minimalmedium

E. coli K12B Zellen wurden in zwei Kulturen wachsen gelassen, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach Erreichen des exponentiellen Wachstums wurde in eine der beiden Kulturen soviel Borrelidin gegeben, daß eine Endkonzentration an Borrelidin von 7 µg/ml Medium resultierte. Der Pfeil zeigt die Zugabe des Borrelidins an, anschließend wurde das Wachstum der Kulturen noch über mehrere Stunden durch Trübungsmessung der Kulturen verfolgt, wie in Material und Methoden beschrieben.

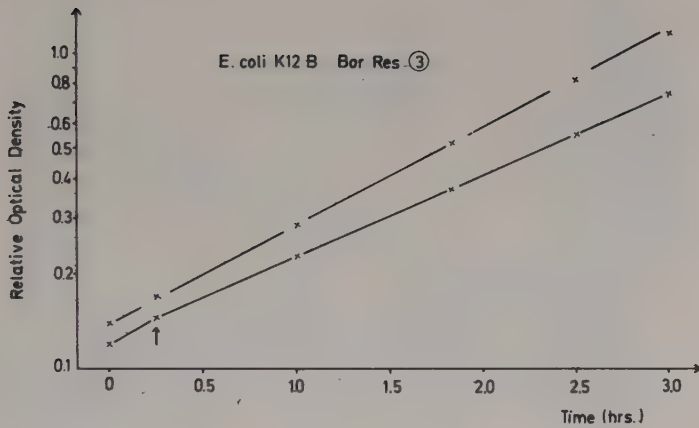


Abb.2: Wirkung von Borrelidin auf die Wachstumsgeschwindigkeit von E. coli K12B Bor Res 3

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 1 angegeben, nur wurde E. coli K12B Bor Res 3 anstelle von E. coli K12B verwendet.

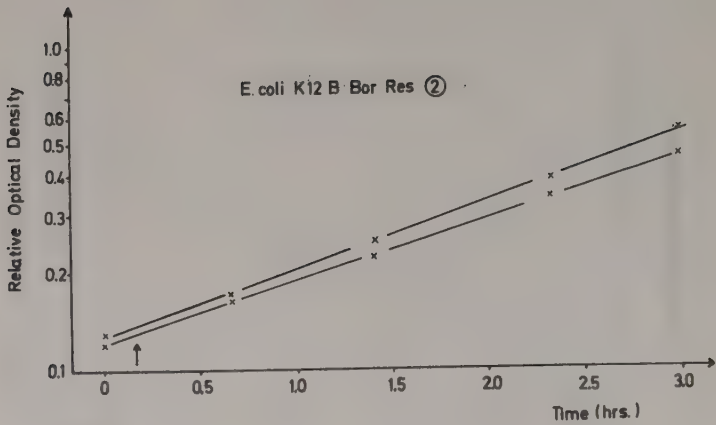


Abb.3: Wirkung von Borrelidin auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* K12B Bor Res 2

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 1 angegeben, doch wurden *E. coli* K12B Bor Res 2 Zellen anstelle von *E. coli* K12B verwendet.

Tabelle 1

Wachstumskonstanten von E. coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3, gewachsen in Minimalmedium mit und ohne Borrelidin.

E. coli Stamm	Wachstumskonstante in	
	Minimal medium	Minimal medium + Borrelidin (7 ug/ml)
K12B	0,69	0,23
K12B Bor Res 2	0,46	0,44
K12B Bor Res 3	0,69	0,60

Die Wachstumsraten wurden berechnet aus der Wachstumsgeschwindigkeit von Kulturen, die mehr als drei Generationszeiten unter den angegebenen Bedingungen gewachsen waren, wie unter Material und Methoden beschrieben; die Borrelidin Konzentration im Medium war 7 ug/ml.

Tabelle 2

Beeinflussung der spezifischen Aktivitäten von Aminoacyl-tRNA-synthetasen aus Zellen, die in Anwesenheit von Borrelidin gewachsen sind.

E. coli Stamm	Wachstumsbedingungen (Minimal Medium supplementiert mit)	Spezifische Aktivität von	
		Threonyl-tRNA Synthetase	Valyl-tRNA Synthetase
K12B	--	0.048	0.101
K12B	Borrelidin	0.018	0.106
Bor Res 2	--	0.115	0.123
Bor Res 2	Borrelidin	0.024	0.135
Bor Res 3	--	0.189	0.110
Bor Res 3	Borrelidin	0.048	0.120

E. coli K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 wurden in Minimalmedium wachengelassen, in jeweils 2 Kulturen, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde in jeweils eine der Kulturen so viel Borrelidin gegeben, daß im Medium eine Borrelidinkonzentration resultierte von 7 µg/ml. Nach Wachstum der Zellen über weitere drei Generationszeiten wurden die Zellen geerntet, Rohextrakt hergestellt und die spezifischen Aktivitäten der Aminoacyl-tRNA-synthetasen bestimmt, wie unter Material und Methoden angegeben.

3.3. Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19, K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3

Im folgenden wird die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B in Einzelheiten beschrieben. Tab. 3 zeigt, daß mit 50 %-iger Ammoniumsulfatsättigung 60 % der Threonyl-tRNA-synthetase präzipitiert wird, wobei eine dreifache Reinigung des Enzyms gegenüber dem ribosomenfreien Überstand erreicht wurde. Die restlichen 40 % der Threonyl-tRNA-synthetase sind fast ausschließlich auf die 45 % und 55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktion verteilt; ein Enzymverlust oder eine Inaktivierung durch die Behandlung mit Ammoniumsulfat war nicht zu beobachten. Die Threonyl-tRNA-synthetasefraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde auf der DEAE-cellulose-Säule weiterfraktioniert; Abb. 4 zeigt das Elutionsdiagramm dieser Säulenchromatographie. Die Threonyl-tRNA-synthetase wird mit einer Molarität von 1,8 molar Kaliumphosphat von der Säule eluiert. Wie in Tab. 4 angegeben, wurden die einzelnen Fraktionen in 4 Fraktionen (P_1 - P_4) zusammengegeben und nach der Konzentrierung nochmals ihr Threonyl-tRNA-synthetase- und Proteingehalt bestimmt; P_1 enthält 47 % der aufgetragenen Threonyl-tRNA-synthetase aktivität mit einer zusätzlichen 4-fachen Anreicherung. Die Summierung der Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen ergab, daß alles aufgetragene Protein wieder eluiert wurde, während ungefähr 30 % der aufgetragenen Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität nach der DEAE-chromatographie nicht wiedergefunden wurde.

P_1 der DEAE-cellulose chromatographie wurde anschließend weiter gereinigt über eine Hydroxylapatitsäule. Abb. 5 zeigt das Elutionsdiagramm dieser Säulenchromatographie. Die Threonyl-tRNA-synthetase wurde mit einer Kaliumphosphatkonzentration von 0,2 molar eluiert. Tab. 5 zeigt, wie die einzelnen Fraktionen der Hydroxylapatitsäule zusammengegeben wurden und deren Protein- und Threonyl-tRNA-synthetasegehalt. Die Fraktionen 60-81 enthalten 43 % der aufgetragenen Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität mit einer weiteren 7-fachen Reinigung. Die Summierung der eluierten Proteinmengen ergab, daß ungefähr das gesamte Protein wieder eluiert wurde, wobei aber ungefähr 50 % der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität nicht aufzufinden war.

Die Bilanz der Proteinmengen ist jedoch insofern wahrscheinlich zu hoch angegeben, da in einigen Fraktionen der DEAE-Säulenfraktionierung und der Hydroxylapatitsäulenfraktionierung Proteinkonzentrationen

Tabelle 3

Ergebnis des 1. Schrittes zur Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase (Ammoniumsulfatfällung aus E. coli K12B)

Fraktionen der (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung (% (NH ₄) ₂ SO ₄ -Sättigung)	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Protein total (mg)	spezifische Aktivität (Einheiten/mg Protein)	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
40	11.7	17.6	205.9	0.044	9.1	4.5	0.8
45	12.4	24.0	297.6	0.127	37.8	19.0	2
50	17.0	41.6	707.2	0.170	120.2	60.0	3
55	14.9	32.0	476.8	0.051	24.3	12.0	1
60	15.8	30.3	481.7	0.008	3.9	2.0	0.1
65	16.0	23.8	380.8	0.002	0.8	0.4	-
75	25.2	16.1	405.7	0.001	0.04	0.02	-
Überstand der 75 % Fällung	1010	0.65	656.5	0.002	0.13	0.07	-
0 (ribosomenfreier Rohextrakt)	180	20.5	3690.0	0.056	206.6	100	1

Ausgangsmaterial waren 180 ml ribosomenfreier Rohextrakt aus E. coli K12B, hergestellt wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Ammoniumsulfatfällung, Bestimmung der Proteinkonzentration und der Threonyl-tRNA-synthetase-Aktivität wurde ebenfalls wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Alle Werte beziehen sich auf die Fraktionen nach der Aufnahme in Puffer A und der anschließenden Dialyse.

Tabelle 4

Ergebnis des 2. Schrittes zur Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E.coli K12B, der DEAE-cellulose chromatographie

Fraktionsnummer der DEAE-chromatographie	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (mg/ml)	Totales Protein (mg)	Spezifische Aktivität (Einheiten/mg)	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
60-80 (P_1)	11.2	7.1	79.5	0.700	55.7	47	4.5
81-105 (P_2)	11.0	7.0	77.0	0.071	5.5	5	0.4
54-56 (P_3)	10.2	5.0	51.0	0.138	7.1	6	0.8
1-53; 106-175 (P_4)	2000	0.2	400.0	0.012	4.8	4	-
Überstand der eingeengten Fraktionen	550	0.15	82.5	0.025	2.1	2	-
Ausgang	22	34.0	750	0.174	130.5	100	1

Die Durchführung der DEAE-cellulose chromatographie ist in Abb. 4 und Material und Methoden ausführlich beschrieben. Die Tabelle zeigt die zusammengegebenen eluierten Fraktionen der Säule, ihre Volumina, Proteinkonzentrationen und Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität nach der Einengung und Dialyse der zusammengegebenen Fraktionen, außer P_4 und der Überstand, die unkonzentriert aufgeführt sind. Die Tabelle gibt außerdem die Ausbeute und den Reinigungsfaktor der Threonyl-tRNA-synthetase in diesem Reinigungsschritt an. Die Bestimmung der Proteinkonzentration und der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität wurde wie in Material und Methoden durchgeführt.

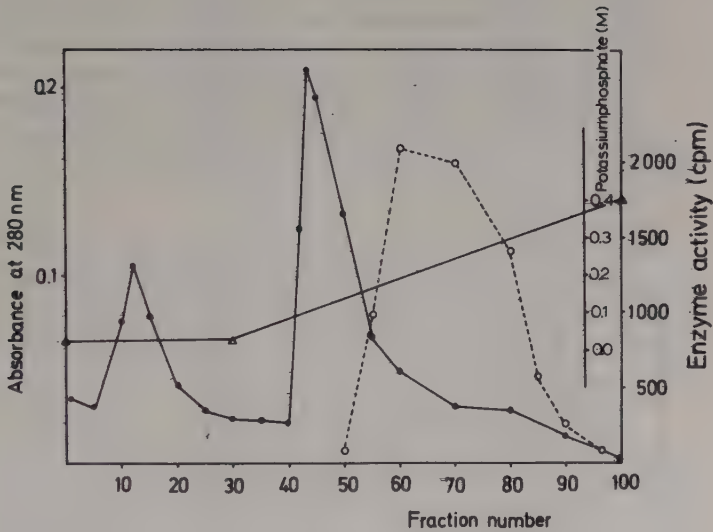


Abb.5: Elutionsdiagramm der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Aufgetragen wurden 7.0 ml der DEAE-cellulose-fraktion mit der höchsten Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität, d.h. 35,8 Threonyl-tRNA-synthetase Einheiten, in 51,1 mg Protein. Die Chromatographie wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde in den eluierten Fraktionen die optische Dichte bei 280 nm (●—●—●—), die Threonyl-tRNA-synthetase-Aktivität (o--o--o) bestimmt, wie in Abb. 4 angegeben. Δ—Δ—Δ zeigt den Verlauf der Kaliumphosphat Gradienten.

Tabelle 5

Ergebnis des 3. Schrittes zur Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B, der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Fraktions- nummer der Hydroxylapatit- chromatographie	Volumen (ml)	Proteinkon- zentration (mg/ml)	Totales Protein (mg)	Spezifische Aktivität (Einheiten/mg)	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
60-81	8,5	0,35	3,0	5,00	15,0	43	7
1-59; 82-98	680	0,13	88,4	0,02	1,8	5	-

Die Durchführung der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie ist in Abb. 5 und Material und Methoden beschrieben. Weitere Einzelheiten sind in der Legende zu Tab. 4 zu finden, nur daß es sich in Tab. 5 um die Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule handelt und nur die Fraktionen 60-81 eingeengt wurden.

von kleiner als 0.2 mg/ml vorhanden waren. Es ist jedoch bekannt, daß die hier verwendete Proteinbestimmungsmethode nach Lowry et al. (1951) bei Werten unter 0,5 mg/ml zu hohe Werte anzeigt, außerdem stört dann auch das vorhandene Mercaptoäthanol die Proteinbestimmung (Bennet 1967). Bestehen bleibt aber der Befund, daß in beiden Säulenfraktionierungsschritten ungefähr 50 % der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität verloren geht. Tab. 6 faßt die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B noch einmal zusammen: es wurde insgesamt eine 90-fache Reinigung erzielt in einer Ausbeute von 8 %.

Die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 verlief qualitativ wie für das Enzym aus K12B beschrieben. Tab. 7 faßt die Ergebnisse der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19, Tab. 8 aus E. coli K12B Bor Res 3 und Tab. 9 aus E. coli Bor Res 2 zusammen. In allen drei zuletzt genannten Fällen ist die Reinigung weniger als 50-fach; dies ist zum Teil bei E. coli A 19 und K12B Bor Res 3 auf die weniger scharfe Schneidung der Fraktionen der Säulenchromatographie zurückzuführen. Bei der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 2 trägt zu der schlechteren Reinigung folgender Befund bei: nach Behandlung mit Ammoniumsulfat verliert das Enzym im Gegensatz zu den Threonyl-tRNA-synthetasen aus den anderen untersuchten E. coli stammen ungefähr 30 % seiner Aktivität. Tab. 10 zeigt, daß dieser Aktivitätsverlust schon nach 12-stündiger Dialyse gegen 3,6 molarer Ammoniumsulfatlösung zu beobachten war; in zur Kontrolle nur gegen den Puffer dialysierten Rohextrakt aus E. coli K12B Bor Res 2 war kein Aktivitätsverlust zu beobachten.

3.4. Untersuchung der Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität

Abb. 6 zeigt, daß über eine Inkubationszeit von 16 Min. die gemessene Threonyl-tRNA-synthetase aktivität (Enzyme Units) proportional zur Inkubationszeit ansteigt, wenn gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19 verwendet wurde; dies zeigt also, daß bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten für die Bestimmung der Threonyl-tRNA-

Tabelle 6

Zusamentassung der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B

Fraktion	Totales Volumen (ml)	Protein mg/ml	Spez. Aktivität (Einheiten/mg)	Einheiten/ ml	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Ribosomen- freier Roh- extrakt	180	20.5	0.056	1.14	206.6	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	22	34.0	0.174	6.0	130.0	63	3
DEAE-cel- lulose	11.2	7.1	0.700	5.0	55.7	23	12
Hydroxyla- patit	8.5	0.35	5.000	1.5	14.0	8	90

Die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase ist in den Tabellen 3, 4 und 5, den Abbildungen 4 und 5 und in Material und Methoden ausführlich beschrieben.

Tabelle 7

Zusammenfassung der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A19

Fraktion	Totales Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Spez. Aktivität (Einheiten/mg)	Einheiten/ml	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Ribosomen- freier Roh- extrakt	315.0	15.0	0.051	1.1	241	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	29.0	17.6	0.160	2.7	76	32	3
DEAE-Cel- lulose	15.0	6.0	0.396	2.4	36	15	8
Hydroxyla- patit	7.5	1.5	1.710	2.3	19	8	35

Die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase und die Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität sind in Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 8

Zusammenfassung der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 3

Fraktion	Totales Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Spez. Aktivität (Einheiten/mg)	Einheiten/ml	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Ribosomen- freier Roh- extrakt	170.0	17.8	0.108	1.9	327.0	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	32	23.3	0.260	6.0	194.0	59	2.5
DEAE-cellu- lose chroma- tographie	16	16.9	0.550	9.3	149.0	45	5
Hydroxyla- patit chroma- tographie	6	1.5	4.600	6.9	41.4	12	45

Die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase und die Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der enzymatischen Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase sind in Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 9

Zusammenfassung der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 2

Fraktion	Totales Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Spez. Aktivität (Einheiten/mg)	Einheiten/ml	Totale Einheiten	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Ribosomen- freier Roh- extrakt	180	18.5	0.051	0.95	169.8	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	22	21.5	0.095	2.5	54.9	32	1.9
DEAE-cell- ulose chro- matographie	11	5.6	0.240	1.4	14.8	9	4.7
Hydroxylapatit chromatographie	5.5	1.3	0.990	1.5	8.2	5	20

Die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase und die Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der enzymatischen Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase sind in Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 10

Beeinflussung der Threonyl-tRNA-synthetase aktivität von E. coli K12B Bor Res 2 durch Behandlung mit Ammoniumsulfat

K12B Bor Res 2 Rohextrakt behandelt mit	Protein Konzentration (mg/ml)	Spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase (Units/mg Protein x 10 ³)
Kontrolle	8.2	0.083
Präzipitat der (NH ₄) ₂ SO ₄ -behandlung dialysiert gegen Puffer A	5.8	0.055
Überstand der (NH ₄) ₂ SO ₄ -behandlung dialysiert gegen Puffer A	0.8	0.002

4 ml ribosomenfreier Rohextrakt von E. coli K12B Bor Res 2 wurden 12 Std. bei 4° gegen 3,6 molares Ammoniumsulfat in Puffer A dialysiert, dessen pH mit Ammoniak auf pH 7,3 eingestellt worden war. Anschließend wurde das Präzipitat abzentrifugiert (20 Min. 10 000 rpm, Sorvall Rotor SS 34) und in 3 ml Puffer A gelöst und gegen den gleichen Puffer 12 Std. dialysiert. Der Überstand wurde ebenfalls gegen Puffer A dialysiert. Als Kontrolle wurden 4 ml des gleichen Rohextraktes 24 Std. gegen Puffer A bei 4° dialysiert. Anschließend wurde in den drei Proben die Proteinkonzentration und spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase bestimmt, wie in Material und Methoden beschrieben.

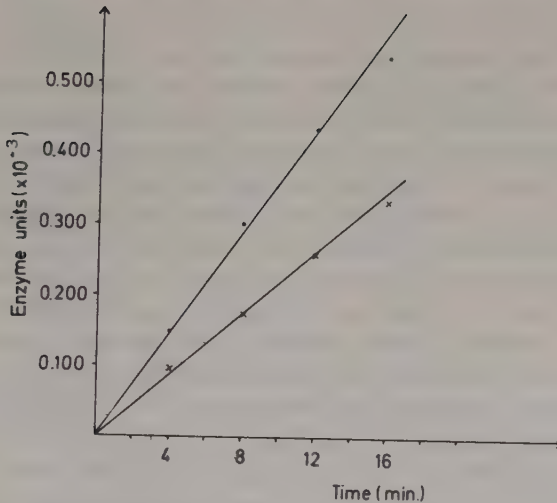


Abb.6: Abhängigkeit der Bildung von Threonyl-tRNA durch die Threonyl-tRNA-synthetase von der Inkubationszeit

Die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde getestet, wie unter Material und Methoden beschrieben, wobei die Inkubation bei 37° zu verschiedenen Zeiten beendet wurde. Als Enzymquelle wurde die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase Fraktion aus E. coli A 19 verwendet; $\times \text{---} \times \text{---} \times$ zeigt die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase von 0,2 µg Protein/0,5 ml Reaktionsgemisch und $\bullet \text{---} \bullet \text{---} \bullet$ die enzymatische Aktivität von 0,4 µg Protein/0,5 ml Reaktionsgemisch.

synthetase Aktivität (s. Methoden) die Inkubationszeit kein limitierender Faktor ist. Wurde anstelle der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B, K12B Bor Res 2 oder K12B Bor Res 3 verwendet, wurde ein gleichartiges Ergebnis erzielt.

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Threonyl-tRNA von der verwendeten Proteinmenge getestet. Abb. 7 zeigt, daß bei der Verwendung von ribosomenfreien Rohextrakt aus *E. coli* A 19 von 10 µg bis zu 100 µg/Reaktionsgemisch eine lineare Abhängigkeit der Menge gebildeter Threonyl-tRNA (Enzym Units) von der verwendeten Proteinmenge unter den gewählten Versuchsbedingungen zu beobachten ist. Entsprechende Ergebnisse wurden erzielt bei der Verwendung von Rohextrakt aus *E. coli* K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3, wenn auch die tatsächlichen Proteinkonzentrationen bei den beiden zuletzt genannten *E. coli* Mutanten entsprechend der höheren Ausgangsaktivität der Threonyl-tRNA-synthetase in diesen Extrakten (s. Tabelle 2) niedriger lagen. Abb. 8 zeigt, daß die Bildungsrate von Threonyl-tRNA ebenfalls linear mit der Proteinkonzentration zunimmt, wenn gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B verwendet wurde. Entsprechende Ergebnisse wurden erhalten, wenn in gleichartigen Versuchsansätzen die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* A 19, K12B Bor Res 2 oder K12B Bor Res 3 verwendet wurde.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das pH-Optimum der enzymatischen Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase untersucht. Tab. 11 gibt eine Zusammenstellung der pH-Optima für andere Aminoacyl-tRNA-synthetasen aus verschiedenen Organismen, die von verschiedenen Autoren bestimmt wurden. Es handelt sich jeweils um die enzymatische Aminoacylierung von tRNA. Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase von dem pH des Versuchspuffers. Es ergab sich, daß das pH Optimum für die Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt von A 19 um pH 8,4 bei der Reaktionstemperatur von 37° liegt; ein gleiches pH Optimum wurde gefunden für die Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt von *E. coli* K12B, K12B Bor Res 3 und K12B Bor Res 2;

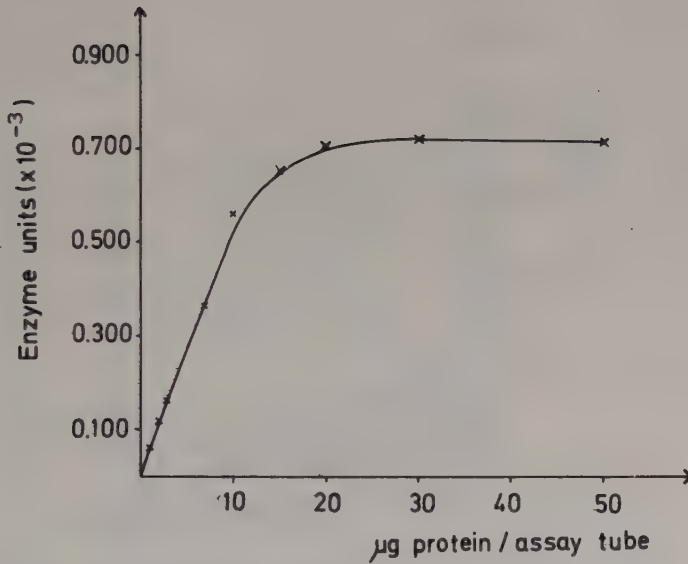


Abb.7: Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Threonyl-tRNA-synthetase von der verwendeten Proteinmenge im Rohextrakt

Die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase im ribosomenfreien Rohextrakt aus *E. coli* A 19 wurde getestet wie in Material und Methoden beschrieben, wobei steigende Mengen an Rohextrakt verwendet wurden.

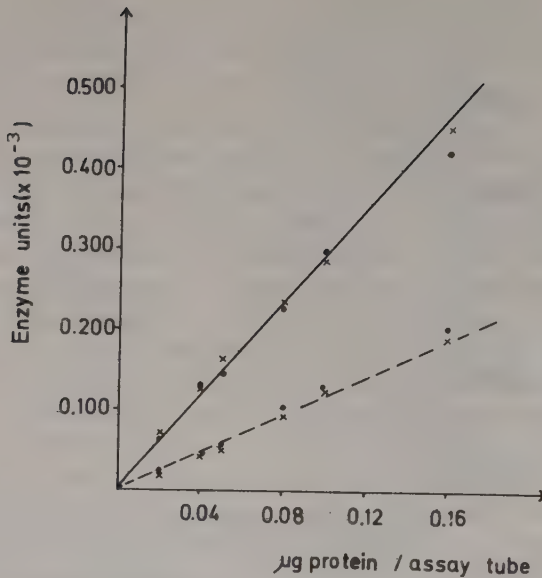


Abb. 8: Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Threonyl-tRNA von der verwendeten Menge gereinigter Threonyl-tRNA-synthetase

Die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde bestimmt wie unter Material und Methoden beschrieben, wobei verschiedene Mengen gereinigter Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B, unterschiedlicher pH und verschiedene tRNA Mengen im Threonyl-tRNA-synthetase-Test verwendet wurden: --- •--- zeigt die gebildete Threonyl-tRNA (Enzym-Units) bei pH 7,3 Tris-buffer und 500 µg tRNA/0,5 ml Reaktionsgemisch, x—x—x— die Enzym-Units bei Verwendung von Trispuffer pH 7,3, jedoch 1250 µg E. coli K12B tRNA/0,5 ml Reaktionsgemisch. —•—•— zeigt die Enzymunits bei Verwendung von Trispuffer pH 8,2 und 500 µg tRNA/0,5 ml Reaktionsgemisch, x—x—x wurde Tris-puffer pH 8,2 und 1250 µg tRNA/0,5 ml Reaktionsgemisch verwendet. Die tRNA stammte in allen Fällen aus E. coli K12B; die Tris-puffer wurden bei 22° mit HCl auf pH 8,2 bzw. pH 7,3 eingestellt.

Tabelle 11

Zusammenstellung der pH Optima einiger bakterieller Aminoacyl-tRNA-synthetasen während der Aminoacyllierung von tRNA

Aminoacyl tRNA-Synthetase	pH Optimum	Organisms	Reference
Histidyl -	7.5 - 8.0	Salmonella typhimurium	DeLorenzio u. Ames (1970)
Lysyl -	8.0	E. coli B (M)	Calendar u. Berg (1966); Waldenström (1968)
Prolyl -	6.9 - 7.5	E. coli B (M)	Mehler u. Jescusky (1966)
Seryl -	8.2 - 8.8	E. coli K12	Katze u. Königsberg (1970)
Phenylalanyl -	7.8 - 8.2	E. coli B	Stulberg (1967)
Arginyl -	8.0	E. coli K12	Hirshfield u. Bloemers (1969)

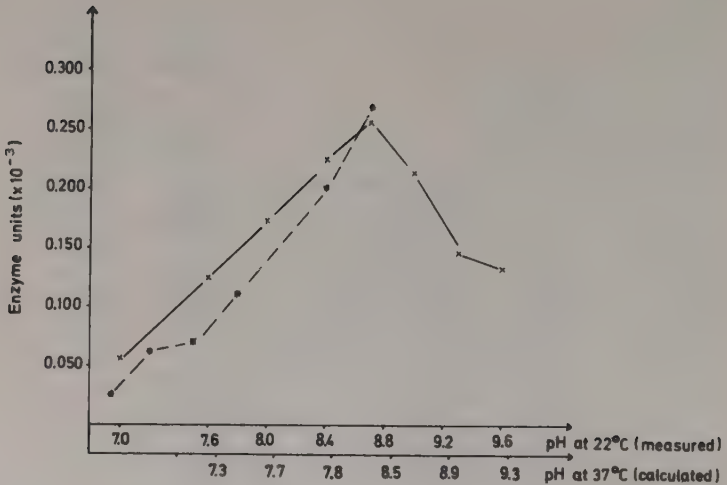


Abb.9: Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Threonyl-tRNA von dem pH des Inkubationspuffer

Die enzymatische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde getestet wie unter Material und Methoden beschrieben, wobei jedoch der Inkubations-Trispuffer verschiedene pH-Werte besaß. Die pH-Werte der Trispuffer wurden bei 22° eingestellt; die untere Skala der Abzisse zeigt die pH-Werte dieser Trispuffer während der Inkubationstemperatur von 37° an. —x—x— gibt die Enzymeinheiten in Abhängigkeit von dem pH-Wert an wenn 3, µg Protein von Rohextrakt aus *E. coli* A 19/0,5 ml Reaktionsgemisch verwendet wurde, *—*—* zeigt die entsprechenden Werte bei Verwendung von 0,5 µg Protein/0,5 ml Reaktionsgemisch der Threonyl-tRNA-synthetase fraktion nach dem 3. Reinigungsschritt (DEAE-cellulose, s. Methoden) einer Aufarbeitung von Rohextrakt aus *E. coli* A 19.

die Threonyl-tRNA-synthetase in gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen aus den entsprechenden E. coli Stämmen zeigte ebenfalls ein pH Optimum um 8,4 unter den Material und Methoden beschriebenen Bedingungen.

Da bekannt ist, daß die nicht-enzymatische Hydrolyse von Threonyl-tRNA in Trispuffer mit steigendem pH zunimmt (Jatica et al. 1966), wurde die Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetase jedoch stets bei einem pH von 7,85 routinemäßig durchgeführt. Der Trispuffer für den Enzymtest (s. Material und Methoden) wurde stets bei 22° auf pH 8,2 eingestellt, wobei sich entsprechend der Temperaturabhängigkeit des pH von Trispuffer (Sigma Chem. Comp. Technical Bulletin No. 106 B) bei der Inkubationstemperatur von 37° ein pH von 7,85 einstellt.

3.5.1 Bestimmung von Enzymkonstanten der Threonyl-tRNA-synthetase

Enzyme sind mittels ihrer Michaelis-Konstanten für ihre Substrate charakterisierbar. Da die Vermutung bestand, daß die Threonyl-tRNA-synthetase aus einer der beiden Borrelidin resistenten E. coli K12-Mutanten ein verändertes Threonyl-tRNA-synthetaseprotein besitzt, während es sich bei E. coli K12B Bor Res 3 um eine vermehrte Bildung handelt, müßte sich dies in den Michaelis Konstanten widerspiegeln.

Deshalb wurden die Michaelis-Konstanten für die Substrate Threonin und ATP bei E. coli A19, K12B und K12B Bor Res 3 und K12B Bor Res 2 bestimmt. Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit der Threonyl-tRNA-synthetase aktivität von der Threonin-konzentration. In Abb. 11 ist die Bestimmung der Michaelis-Konstante nach der Methode von Lineweaver und Burk (1934) für Threonin in den gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen aus den verschiedenen E. coli stämmen zu sehen. Abb. 12 zeigt die entsprechende Bestimmung der Michaelis-Konstante für das Substrat ATP. Die sich aus diesen Bestimmungen ergebenden Michaelis-Konstanten sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Daraus ist zu ersehen, daß die Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A19, K12B und K12B Bor Res 3 für Threonin die gleiche Michaelis-Konstante besitzen, nämlich $8 \times 10^{-5} M$ die Michaelis-Konstante der Threonyl-tRNA-

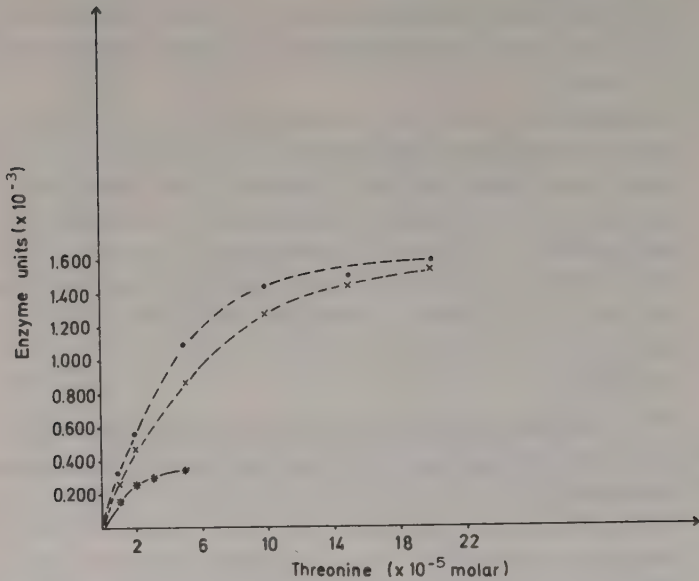


Abb.10: Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Threonyl-tRNA von der verwendeten Threonin-konzentration

Die Threonyl-tRNA-synthetase-aktivität wurde bestimmt, wie unter Material und Methoden beschrieben, wobei jedoch verschiedene Threoninkonzentrationen ($1 - 20 \times 10^{-5}$ Molar) verwendet wurden. -x--x- gibt die Enzymeinheiten in Abhängigkeit von der Threonin-Molarität an, wenn $0,1 \mu\text{g Protein}/0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* verwendet wurden; •-•-•-•- zeigt die entsprechende Kurve bei Verwendung von $0,1 \mu\text{g Protein}/0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B Bor Res 3 und *—*—* bei Verwendung von $0,4 \mu\text{g Protein}/0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B Bor Res 2.

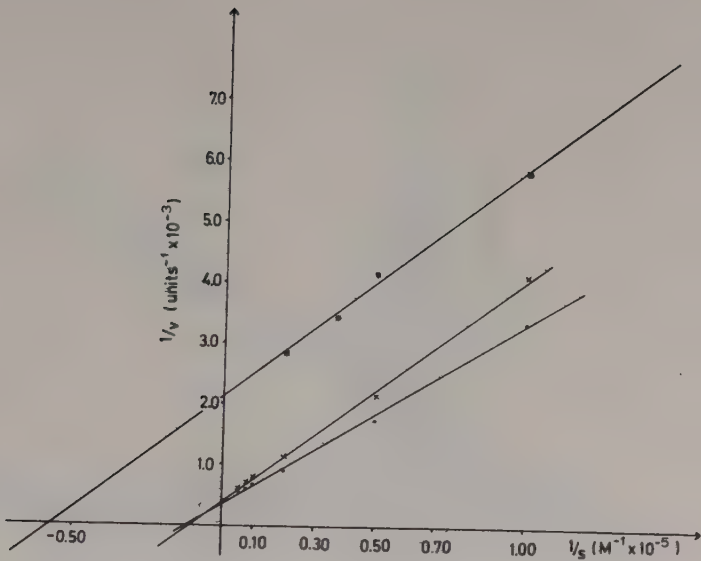


Abb.11: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Threonyl-tRNA-synthetase für Threonin.

Die Konstanten wurden nach der Methode von Lineweaver und Burk 1934 graphisch bestimmt. Die experimentelle Einzelheiten sind aus Abb. 10 zu ersehen. x—x zeigt die Werte für die Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B; —•—• für die Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 3 und —*—* für die Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 2.

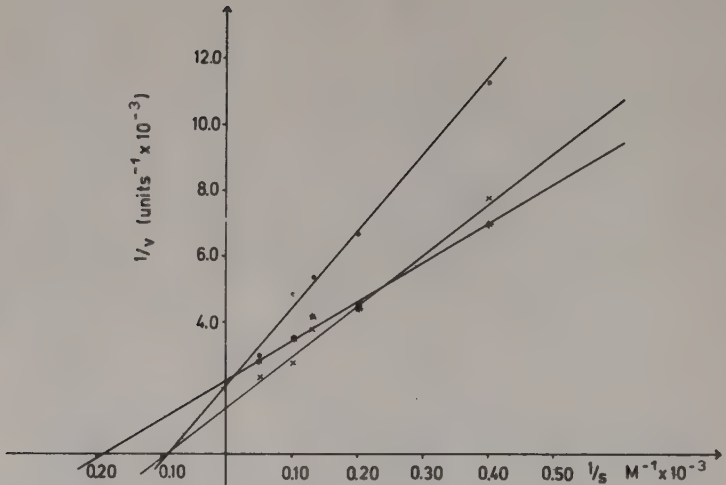


Abb.12: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante der Threonyl-tRNA-synthetase für ATP

Die Konstanten wurden nach der Methode von Lineweaver und Burk 1934 graphisch bestimmt. Die Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt, wobei verschiedene ATP-konzentrationen ($2,5$ bis 20×10^{-5} molar) und $1250 \mu\text{g}$ E. coli K12B tRNA/Reaktionsgemisch verwendet wurden. Die Proteinkonzentrationen der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen waren: pro $0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch $0,1 \mu\text{g}$ der Fraktion aus E. coli K12B, $0,1 \mu\text{g}$ aus E. coli K12B Bor Res 3 und $0,4 \mu\text{g}$ Protein aus E. coli K12B Bor Res 2. —x— zeigt die Werte für E. coli K12B-Enzym.

•—•—• für das K12B Bor Res 3 Enzym und *—*—* für das E. coli K12B Bor Res 2 Enzym.

Tabelle 12

Michaelis-Menten-Konstanten der Threonyl-tRNA-synthetase für Threonin und ATP

E. coli	K _m (Threonin)	K _m (ATP)
A19	8.3×10^{-5} M	1.2×10^{-4} M
K12 B	8.5×10^{-5} M	1.2×10^{-4} M
K12B Bor Res (3)	8.2×10^{-5} M	1.0×10^{-4} M
K12B Bor Res (2)	1.7×10^{-5} M	5.2×10^{-5} M

Es sind die sich aus den Abbildungen 10-12 ergebenden Enzymkonstanten zusammengefaßt. Außerdem sind die Konstanten auch für die gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus E. coli A19 angegeben; sie wurden bestimmt, wie die für die Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus E. coli K12B, (s. Abb. 10-12), wobei bei der Bestimmung der K_m-Werte für Threonin und für ATP 0,26 µg Protein der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A19/0.5 ml Reaktionsgemisch verwendet wurde.

synthetase dieser drei Stämme für das Substrat ATP ist ebenfalls identisch, nämlich $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Die entsprechenden Konstanten in der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase-fraktion aus E. coli Bor Res 2 Zellen unterscheiden sich jedoch von diesen Werten: Die Michaelis-Konstante für Threonin ist $1,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ und für ATP ist $5,2 \times 10^{-5} \text{ M}$. Wurden die Michaeliskonstante für Threonin in den Rohextrakten der vier E. coli Zellarten bestimmt, dann ergaben sich Werte, die in Tab. 13 zusammengefaßt sind. Es zeigt sich, daß die Werte im Falle der Threonyl-tRNA-synthetase in Rohextrakten aus E. coli K12B und K12B Bor Res 3 identisch sind mit denen, für die Threonyl-tRNA-synthetase in den entsprechenden gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen; die Michaelis-Konstante für die Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt aus E. coli K12B Bor Res 2 ist jedoch noch um den Faktor 3 kleiner, also $0,6 \times 10^{-5} \text{ molar}$, als die des Enzyms in der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion. Dies weist möglicherweise auf eine Labilität des Enzyms hin, die schon bei der Behandlung des Rohextraktes mit Ammoniumsulfat zu beobachten war. Die Michaelis-Konstante für das Substrat tRNA wurde nicht bestimmt, da bei Verwendung von E. coli B tRNA oder E. coli K12 tRNA keine übliche Substratsättigungskurve erhalten wurde; in diesem Zusammenhang ist interessant, daß weder Allende et al. (1966) noch Hirsh (1968) in ihren Arbeiten über die Threonyl-tRNA-synthetase aus Rattenleber bzw. E. coli B einen Km-Wert für tRNA angaben, wohl aber für die beiden anderen Substrate des Enzyms.

3.5.2. Untersuchung der Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Borrelidin

Da Inhibitorkonstanten zur Charakterisierung eines Enzyms beitragen (s. Dixon u. Webb, 1964) wurde im Folgenden die Hemmung der Threonyl-tRNAs-synthetase-fraktionen aus E. coli K12B, K12B Bor Res 3 und K12B Bor Res 2 untersucht. Mittels der Methode nach Dixon (1952) kann die Art und Spezifität der Hemmung eines Enzyms durch einen Inhibitor graphisch bestimmt werden. Hierfür wird die Enzymaktivität gemessen unter Verwendung von verschiedenen limitierenden Mengen eines Substrats und steigenden Mengen des Inhibitors. Abb. 13 zeigt die Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B durch

Tabelle 13

Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten der Threonyl-tRNA-synthetase für Threonin im Rohextrakt und in den zugehörigen gereinigten Enzymfraktionen

E. coli	Km (Threonin)	
	gereinigte Fraktion	Rohextrakt
K12B	$8.5 \times 10^{-5} M$	$7.7 \times 10^{-5} M$
K12B Bor Res (3)	$8.2 \times 10^{-5} M$	$8.0 \times 10^{-5} M$
K12B Bor Res (2)	$1.7 \times 10^{-5} M$	$0.6 \times 10^{-5} M$

Der Km-Wert für Threonin in den gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen wurde bestimmt, wie den Abb. 10-12 zu entnehmen ist. Die Km-Werte in den Rohextrakten wurde auf die gleiche Weise bestimmt, jedoch wurden anstelle der gereinigten Enzymfraktionen im Enzymtest folgende Mengen an Rohextrakten verwendet: 4.0 ug Protein/0.5 ml Reaktionsgemisch E. coli K12B; 1.5 ug Protein/0.5 ml Reaktionsgemisch E. coli K12B Bor Res 3; 3.0 ug Protein/0.5 ml Reaktionsgemisch E. coli K12B Bor Res 2. Die tRNA-Konzentration betrug 1250 ug/0.5 ml Reaktionsgemisch. Die Herstellung der Rohextrakte erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Borrelidin unter Verwendung limitierender Mengen von Threonin, aufgetragen nach der Methode von Dixon (1952). In Abb. 14 ist die entsprechende Bestimmung bei Verwendung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B Bor Res 3 und in Abb. 15 bei Verwendung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B Bor Res 2 dargestellt. Die Abbildungen zeigen, daß in allen drei Fällen die Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Borrelidin nicht kompetitiv in Bezug auf Threonin geschieht. Außerdem ist zu ersehen, daß die Inhibitor-Konstante (K_i) für Borrelidin bei der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B und K12B Bor Res 3 3×10^{-9} molar Borrelidin ist; der Wert für die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A19 war ebenfalls 3×10^{-9} M. Für die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 war der K_i -Wert jedoch $7,5 \times 10^{-9}$ molar Borrelidin. Sie ist also im Vergleich zu dem K_i -Wert aus den anderen *E. coli* Zellen um den Faktor 2,5 größer.

3.6 Untersuchung der Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase

Aus dem Verlauf der Hitzeinaktivierung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen in An- oder Abwesenheit von Substraten sind wiederholt Aussagen über die katalytischen Eigenschaften dieser Enzyme abgeleitet worden (s. Yaniv u. Gros 1969; Chlumecka et al. 1970; Berry u. Grunberg - Manago 1970). Ähnliche Versuche wurden auch für die Threonyl-tRNA-synthetase angestellt. Zunächst wurden Versuche durchgeführt zur Feststellung der geeigneten Inkubationstemperatur. Abb. 16 zeigt, daß bei der Verwendung von einer Inkubationstemperatur von 60°C die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A19 unter den gewählten Bedingungen in 8 Minuten um 50 % inaktiviert wird; bei einer Versuchstemperatur von 55°C betrug die Zeit für die 50 %-ige Inaktivierung 23 Min. und bei 65°C 5 Min. Die folgenden Versuche wurden deshalb bei einer Versuchstemperatur von 60°C durchgeführt. Abb. 17 zeigt, die Hitzeinaktivierung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A19 in An- und Abwesenheit von Substraten. Es zeigt sich, daß tRNA die 50 %-ige Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase von 8 Min. auf 5 Min. verkürzt; eine Vorinkubation mit ATP hat einen ähnlichen Effekt, doch bewirkt die Hitzebehandlung der Threonyl-tRNA-synthetase in Anwesenheit von Threonin eher eine

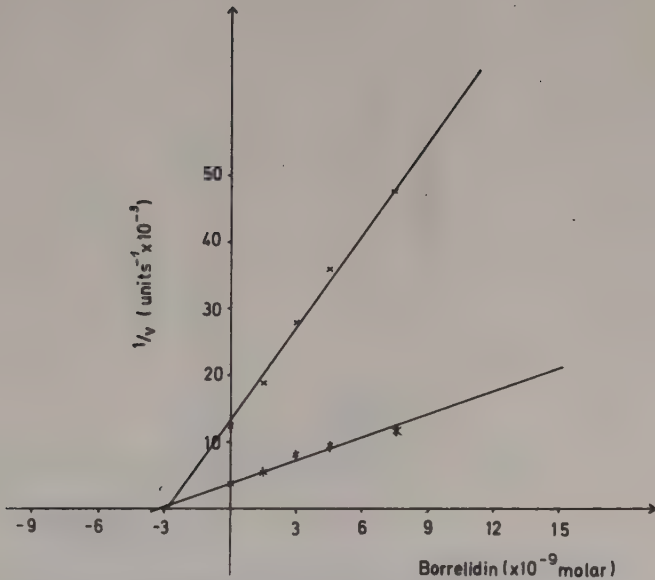


Abb.13: Bestimmung der Inhibitorkonstante für Borrelidin der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B

Die Konstante wurde nach der Methode von Dixon (1952) bestimmt. Hierfür wurde die Threonyl-tRNA-synthetase aktivität bestimmt, wie in Material und Methoden beschrieben, jedoch wurden zu den Ansätzen steigende Mengen Borrelidin (0 bis 15×10^{-9} molar Borrelidin Endkonzentration) zugegeben; x—x zeigt die Werte bei der Verwendung von 5×10^{-6} molar Threonin Endkonzentration, *—*—* die Werte, wenn 20×10^{-6} molar Threonin verwendet wurden. In allen Fällen wurde $0,1 \mu\text{g}$ Protein/ $0,5$ ml Reaktionsgemisch gereinigte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus E. coli K12B verwendet.

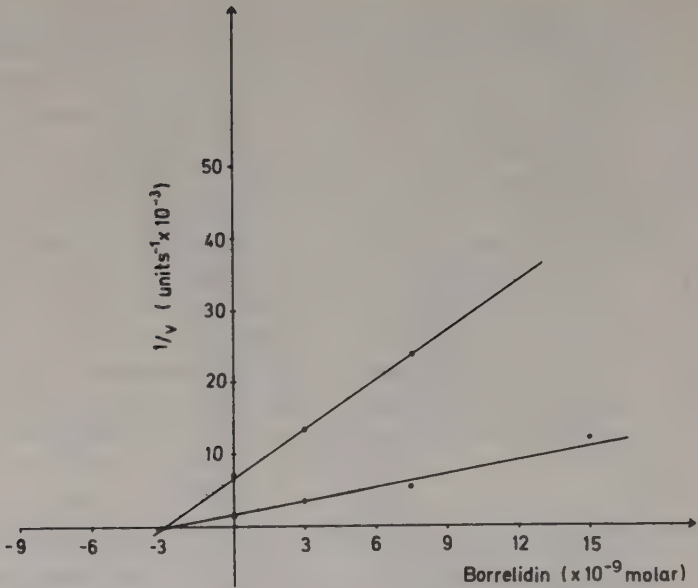


Abb.14: Bestimmung der Inhibitorkonstante für Borrelidin der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 3

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 13 angegeben, jedoch wurden $0,1 \mu\text{g}$ Protein/ $0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch gereinigter Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 3 verwendet.

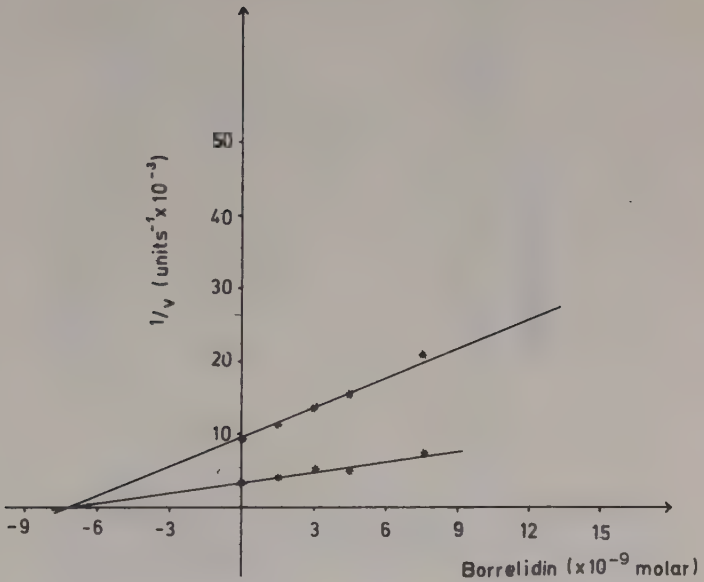


Abb.15: Bestimmung der Inhibitorkonstante für Borrelidin der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 2

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 13 angegeben, jedoch wurde 0,5 μg Protein/0,5 ml Reaktionsgemisch gereinigter Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus E. coli K12B Bor Res 2 verwendet.

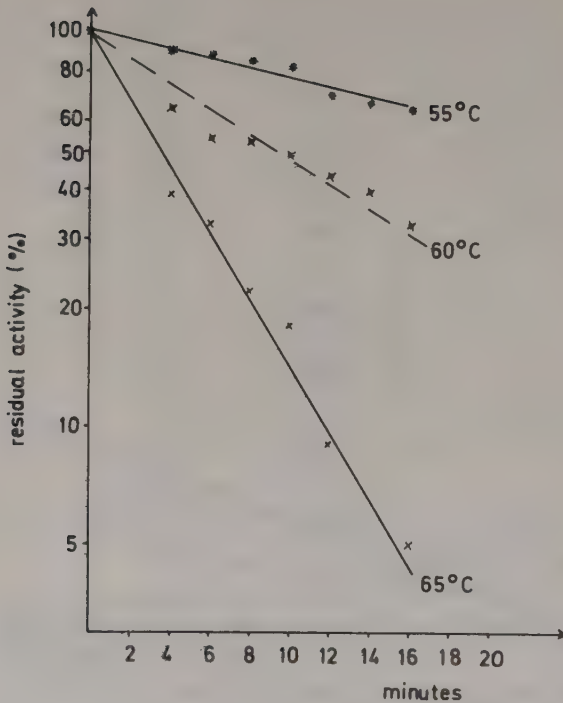


Abb.16: Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19, bei verschiedenen Temperaturen

Die Vorbehandlung der Threonyl-tRNA-synthetasefraktion bei verschiedenen Temperaturen und die anschließende Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. * — * zeigt die Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase bei 55°C; die Proteinkonzentration der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase betrug 4 µg/ml während der Vorinkubation und 0,4 µg/0,5 ml Reaktionsgemisch während der Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität. x — x zeigt die Hitzeaktivierung des Enzyms während einer Temperatur von 60°C; die Proteinkonzentration während der Vorinkubation betrug 3 µg/ml und 0,3 µg/0,5 ml Reaktionsgemisch während des Enzymtests. x — x gibt die Hitzeinaktivierung bei einer Temperatur von 65°C wieder; die Proteinkonzentrationen waren identisch mit denen bei der Temperatur von 60°C.

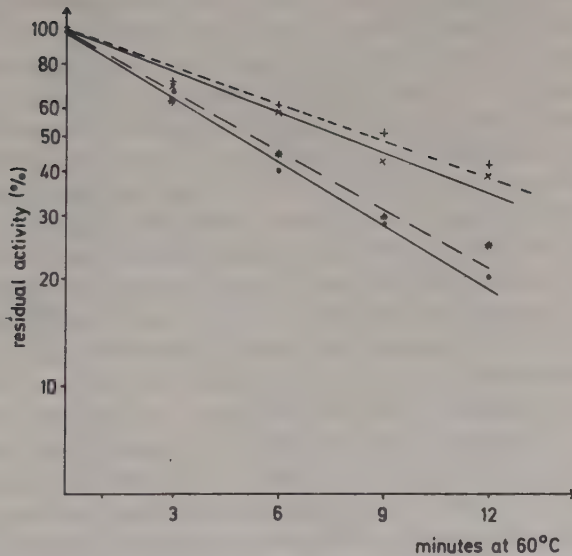


Abb.17: Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli A 19 bei 60°C in An- und Abwesenheit von Substraten.

Die Vorbehandlung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase-fraktion aus E. coli A 19 und die anschließende Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität wurde durchgeführt, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Temperatur der Hitzebehandlung war 60°C. —x—x zeigt die Inaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase in Abwesenheit von Substraten. + — — — während der Anwesenheit von 7×10^{-5} molar Threonin. • — — — während der Anwesenheit von 7×10^{-3} molar ATP, während der Vorinkubation und * — — — während der Anwesenheit von 3,3 mg E. coli B tRNA/ml bei der Vorinkubation. Die Proteinkonzentration während der Vorinkubation war stets 2, μ g/ml und 0,3 μ g/0,5 ml Reaktionsgemisch während der Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität.

Verlängerung der Zeit, bis eine 50 %-ige Inaktivierung erreicht ist. In Abb. 18 ist die Hitzeinaktivierung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B in An- und Abwesenheit von Substraten gezeigt. Es ergibt sich ein entsprechendes Bild, jedoch sind die Zeiten bis zur 50 %-igen Hitzeinaktivierung kürzer, z.B. 4 Min. wenn die Threonyl-tRNA-synthetase ohne Substrate hitzebehandelt wird. In Abb. 19 ist die Hitzeinaktivierung der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus den Borrelidin resistenten Mutanten *E. coli* Bor Res 2 und *E. coli* Bor Res 3 in An- und Abwesenheit von tRNA dargestellt. Bei der Hitzebehandlung ohne tRNA sind in beiden Fällen 8.5 bzw. 9 Minuten nötig, um das Enzym 50 % zu inaktivieren. Ist tRNA während der Hitzebehandlung anwesend, verkürzt sich in beiden Fällen die Zeit zur 50 %-igen Inaktivierung auf 5 Minuten. Die Steigerung der Hitzeempfindlichkeit der Threonyl-tRNA-synthetase durch tRNA ist also bei der Threonyl-tRNA-synthetase aus den beiden Wildtypzellen *E. coli* A19 und K12B sowie bei den Borrelidin resistenten Mutanten *E. coli* Bor Res 3 und *E. coli* Bor Res 2 zu beobachten.

Doch war die Zeit zur 50 % Inaktivierung bei der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B deutlich kürzer als die für das Enzym aus den anderen *E. coli* Zellen. Möglicherweise ist diese gesteigerte Hitzeempfindlichkeit auf die große Reinheit der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B zurückzuführen, denn es zeigte sich, daß die 50 %-ige Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase bei Verwendung von Rohextrakt von *E. coli* K12B bei 60° 12 Min. war, im Vergleich zu den 5 Min. der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus diesen Zellen. Bei der Threonyl-tRNA-synthetase in Rohextrakt von *E. coli* A19 dauerte es ebenfalls 12 Minuten unter gleichen Bedingungen bis zur 50 %-igen Hitzeinaktivierung.

3.7 Immunologische Charakterisierung der Threonyl-tRNA-synthetase

Bisher wurden Antikörper gegen folgende Aminoacyl-tRNA-synthetasen beschrieben: gegen die Phenylalanyl-tRNA-synthetase (Fangman et al. 1965), Isoleucyl- und Valyl-tRNA-synthetase (Yaniv u. Gros, 1969) und Seryl-tRNA-synthetase (Katze u. Konigsberg, 1970) aus *E. coli* K12 und die Tyrosyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* B und *Bacillus*

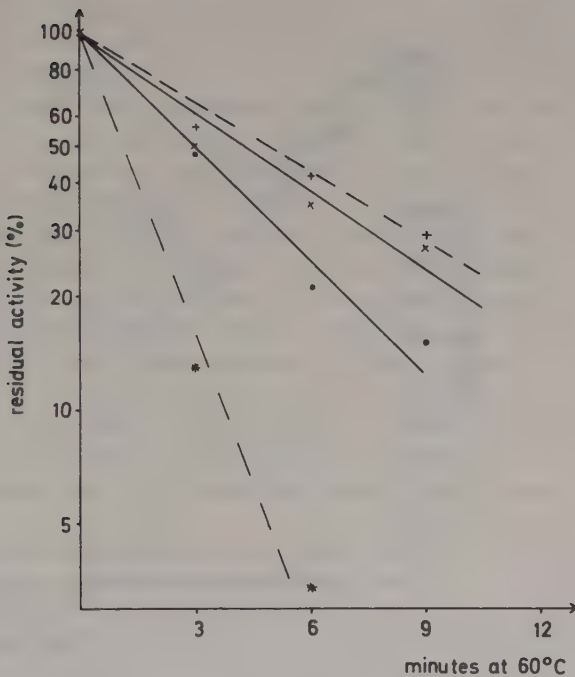


Abb.18: Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B bei 60° in An- und Abwesenheit von Substraten

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 17 beschrieben. Jedoch wurde die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B verwendet. Die Proteinkonzentration während der Hitzebehandlung war 0,8 µg/ml und 0,12 µg/0,5 ml Reaktionsgemisch während der Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität. Außerdem wurde *E. coli* K12B tRNA verwendet 7,5 mg/ml bei der Hitzebehandlung und 1,25 mg/0,5 ml Reaktionsgemisch während der Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität. x---x zeigt die Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase in Abwesenheit von Substraten, +---+ in Anwesenheit von 7×10^{-5} molar Threonin, •---• in Anwesenheit von 7×10^{-3} molar ATP, und *---* in Anwesenheit von 7,5 mg tRNA/ml während der Hitzebehandlung.

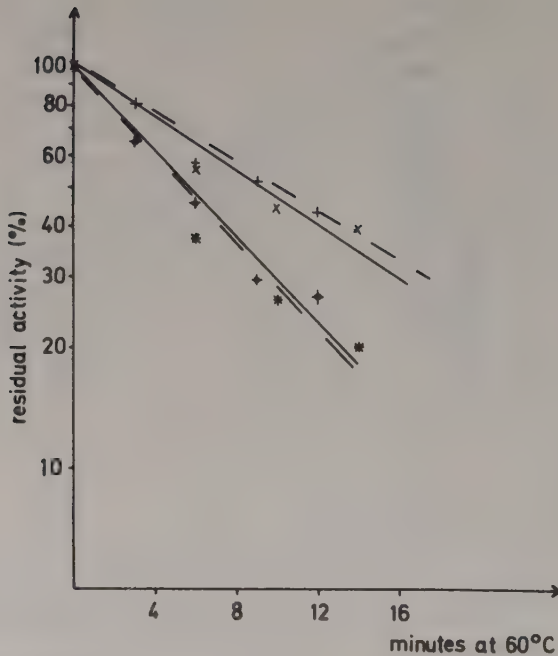


Abb.19: Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli E. coli Bor Res 3 und E. coli Bor Res 2 in An- und Abwesenheit von tRNA.

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 17 beschrieben, jedoch wurde die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus E. coli K12B Bor Res 2 und E. coli K12B Bor Res 3 verwendet. Die Proteinkonzentration während der Hitzebehandlung war 3,3 $\mu\text{g/ml}$ für E. coli K12B Bor Res 2 und 0,67 $\mu\text{g/ml}$ für E. coli K12B Bor Res 3. Während der Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität betrug die Proteinkonzentration für E. coli K12B Bor Res 2 0,5 $\mu\text{g}/0,5\text{ml}$ Reaktionsgemisch und für E. coli K12B Bor Res 3 0,1 $\mu\text{g}/0,5\text{ml}$ Reaktionsgemisch. Es wurde E. coli B tRNA verwendet. $+-+--+$ zeigt die Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 2 in Abwesenheit von Substrat, $+++--+$ in Anwesenheit von 3,3 mg tRNA/ml; $x-x-x$ zeigt die Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus E. coli K12B Bor Res 3 in Abwesenheit von Substrat; $*--*--*$ in Anwesenheit von 3,3 mg/ml tRNA.

Subtilisin (Calendar u. Berg, 1966) und die Histidyl-tRNA-synthetase aus *Salmonella typhimurium* (Lorenzo u. Ames 1970). In all diesen Fällen enthielten die Seren Antikörper, die die enzymatische Aktivität der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-synthetase selektiv hemmen in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Antiserum. Der Vergleich von Neutralisationskurven bei Verwendung von einem bestimmten Antiserum und Enzymen aus verschiedenen Zellen läßt Rückschlüsse auf die strukturelle Verwandtschaft der Enzyme zu (s. Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, Art 2, 493-1154 (1963)). Um die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B und den Borrelidin resistenten Mutanten weiter vergleichend zu charakterisieren, wurden deshalb wie in Material und Methoden beschrieben, Antikörper gegen die Wilttype-Threonyl-tRNA-synthetase hergestellt. Abb. 20 zeigt die Neutralisation der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt aus *E. coli* K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3, in Abhängigkeit von der zugegebenen Antiserummenge. Der gleichartige Verlauf der Neutralisationskurven bei Verwendung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B und K12B Bor Res 3 steht mit der Annahme einer gleichen Struktur dieses Enzyms in den beiden Zellarten in Einklang. Die Neutralisationskurve der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 ist jedoch deutlich anders: um die gleiche Threonyl-tRNA-synthetase aktivität zu neutralisieren, werden mehr als dreimal soviel Antikörper benötigt wie für die Neutralisation des Enzyms aus *E. coli* K12B oder K12B Bor Res 3. Dieser Befund weist auf eine andere Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase in *E. coli* K12B Bor Res 2 hin, als in den Wilttypzellen *E. coli* K12B. Wurde eine Neutralisationskurve unter Verwendung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A19 Rohextrakt hergestellt, war das Bild identisch mit den für das Enzym aus *E. coli* K12B. Aus dem Vergleich der Neutralisationskurven eines Enzyms im Rohextrakt und im gereinigten Zustand lassen sich Rückschlüsse ziehen auf das Vorhandensein von enzymatisch inaktivem Protein im gereinigten Zustand (Suskind, 1957). Deshalb wurden die Neutralisationskurve der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt mit der in der zugehörigen gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase fraktion verglichen: Es ergab sich, daß in der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B (Abb. 21) und aus *E. coli* K12B Bor Res 3 (Abb. 22) keine nennenswerte Mengen an

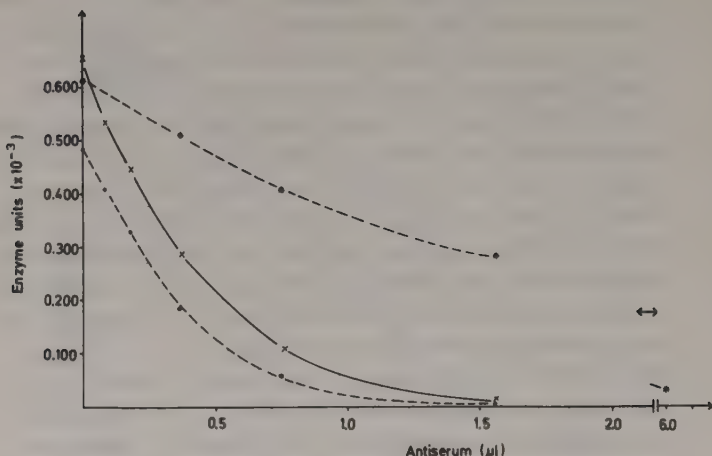


Abb.20: Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in Rohextrakt von *E. coli* K12B, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3.

Die Vorinkubation der Rohextrakte mit dem Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum und die anschließende Bestimmung der Threonyl-tRNA-synthetase aktivität wurde wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. $\times$ — $\times$ — $\times$ zeigt die Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in K12B-Rohextrakt (60 µg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch), $-\times-\times-\times$ in K12B Bor Res 2-Rohextrakt (35 µg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) und $-\cdot-\cdot-\cdot$ in K12B Bor Res 3-Rohextrakt (15 µg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch).

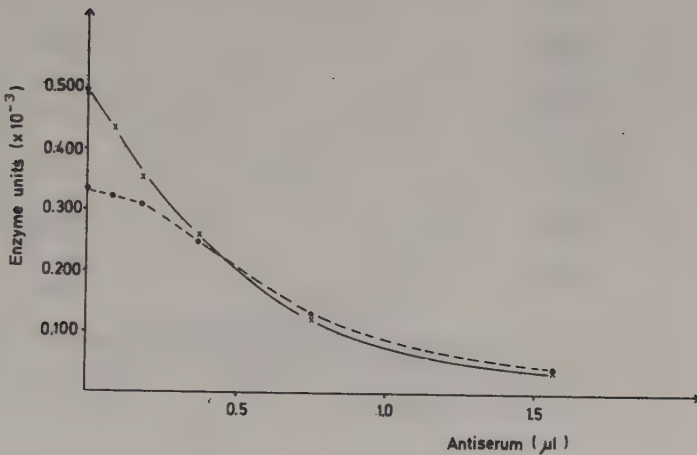


Abb.21: Neutralisationskurve für die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase und in Rohextrakt aus E. coli K12B

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 20 angegeben.

• - - • - - • zeigt die Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Enzymfraktion (0,5 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) und X — x — x in Rohextrakt (45 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) aus E. coli K12B.

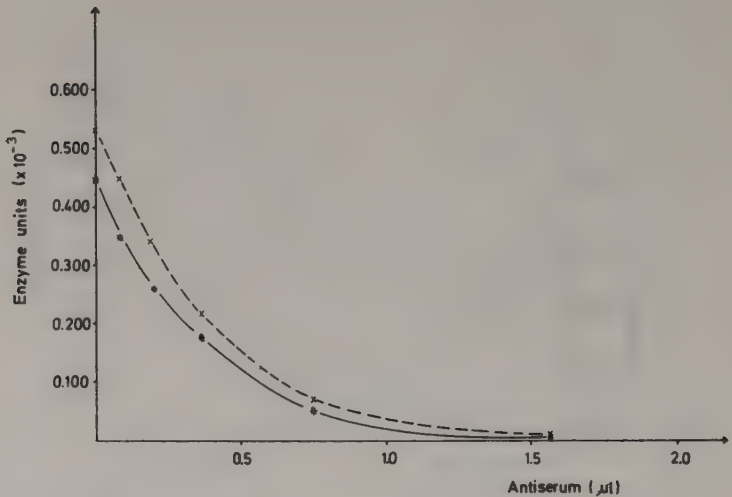


Abb.22: Neutralisationskurve für die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase und im Rohextrakt aus E. coli K12B Bor Res 3

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 20 angegeben,
* — * zeigt die Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Enzymfraktion (0,5 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) und x — — x im Rohextrakt (20 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) aus E. coli K12B Bor Res 3.

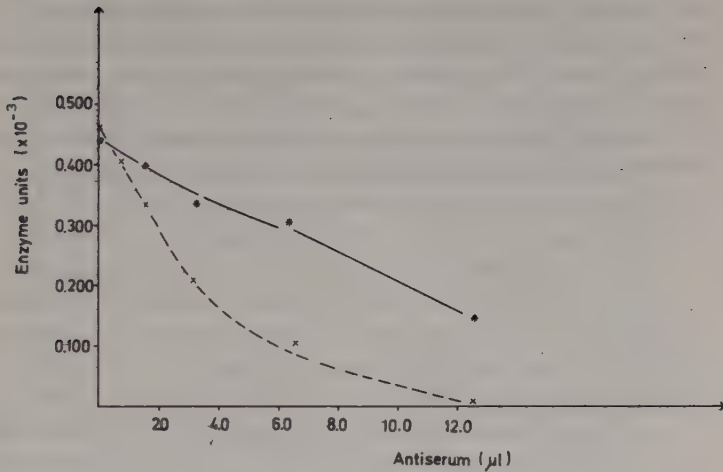


Abb.23: Neutralisationskurve für die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase und im Rohextrakt aus E. coli K12B Bor Res 2.

Experimentelle Einzelheiten sind wie in Abb. 20 angegeben.

——* zeigt die Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Enzymfraktion (3,5 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) und x- - - x- - - x im Rohextrakt (50 μg Protein/0,6 ml Vorinkubationsgemisch) aus E. coli K12B Bor Res 2.

inaktivem Threonyl-tRNA-synthetaseprotein nachzuweisen sind, denn zur Neutralisation einer bestimmten Threonyl-tRNA-synthetase aktivität wird die gleiche Menge Antiserum benötigt, egal ob Rohextrakt oder die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetasefraktion als Enzymquelle dienen. In der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* K12B Bor Res 2 ist jedoch mehr als 50 % enzymatisch inaktive Threonyl-tRNA-synthetase vorhanden (Abb. 23), denn zur Neutralisation der gleichen Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität der gereinigten Fraktion wurde mehr als dreimal so viel Antiserum benötigt, wie zu der in dem Rohextrakt aus diesen Zellen.

4. Diskussion

Die Einteilung von Borrelidin resistenten Mutanten von *E. coli* K12B mit veränderter Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase in Strukturgen- und Regulationsmutanten war bisher nur aufgrund vorläufiger Charakterisierung der Threonyl-tRNA-synthetase in Rohextrakt dieser Zellen vermutet worden (Nass, unveröffentlicht). Zur Prüfung dieser Vermutung wurde die Charakterisierung der Threonyl-tRNA-synthetase in gereinigten Enzymfraktionen aus *E. coli* K12B, A 19, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 durchgeführt. Bisher wurde die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus Rattenleber (Allende et al. 1966) und aus *E. coli* B (Hirsh, 1968) beschrieben. Die Threonyl-tRNA-synthetase aus den vier *E. coli* K12-Stämmen wurde weitgehend nach der Methode von Hirsh (1968) gereinigt. Hierbei war die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase, wie für die Isolierung des Enzyms aus *E. coli* K12B beschrieben, maximal hundertfach, wogegen der Reinigungsfaktor für die Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* B bei Hirsh (1968) 340 betrug. Die Reinigungsmethoden unterschieden sich insofern als die ersten drei Reinigungsschritte der Methode von Hirsh (1968) durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ersetzt wurden; Hirsh (1968) hatte in seinen ersten drei Reinigungsschritten insgesamt eine sechsfache Reinigung des Enzyms erhalten, im vorliegenden Fall ergab die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eine dreifache Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase. Die anschließenden Reinigungsschritte, DEAE-cellulose- und Hydroxylapatitsäulenchromatographie wurden wie von Hirsh (1968) angegeben durchgeführt; der Reinigungsfaktor mit ungefähr acht auf der Hydroxylapatitsäule war in beiden Fällen gleich, auf der DEAE-cellulosesäule erhielt Hirsh (1968) jedoch eine neunfache Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* B, während bei der Isolierung des Enzyms aus *E. coli* K12-Zellen die Reinigung maximal vierfach war. Es ergibt sich die Frage, ob diese unterschiedliche Anreicherung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12- und B-Zellen auf die Unterschiede in dem Reinigungsverfahren zurückzuführen sind oder auf eine unterschiedliche Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase in diesen Zellen. Ein Hinweis auf letztere Möglichkeit sind die unterschiedlichen Eigenschaften der Valyl- und Isoleucyl-tRNA-synthetase

aus *E. coli* K12 und B (Kondo u. Woese 1969).

Ein weiterer Hinweis auf die unterschiedliche Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* B und K12 ist der Befund, daß der K_m -Wert für Threonin der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B und A 19, $8 \times 10^{-5} M$, der Wert für das Enzym aus *E. coli* B (Hirsh 1968) hingegen nur 1×10^{-5} betrug. Da der K_m -Wert für Threonin in den gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen sowie in dem Rohextrakt aus *E. coli* K12B und A 19 den gleichen Wert, nämlich $8 \times 10^{-5} M$ aufwies, ist der unterschiedliche Wert für das Enzym aus *E. coli* B vermutlich nicht auf die unterschiedliche Reinheit der Enzyme aus diesen Zellen zurückzuführen. Für die Histidyl-tRNA-synthetase aus *Salmonella typhimurium* sind auch gleichartige K_m -Werte für Histidin in einer rohen Enzymfraktion (Roth u. Ames 1966) und einer gereinigten Enzymfraktion (DeLorenzo u. Ames 1970) beschrieben, ebenso für die Seryl-tRNA-synthetase in gereinigter Form und im Rohextrakt aus *E. coli* K12 (Hoffmann et al. 1970). Der K_m -Wert für das Substrat ATP der Threonyl-tRNA-synthetase war mit $1 \times 10^{-4} M$ für das Enzym aus *E. coli* K12B und A 19 wie der von Hirsh (1968) angegebene Wert für das Enzym aus *E. coli* B.

Die entsprechenden K_m -Werte für die Threonyl-tRNA-synthetase in den gereinigten Enzymfraktionen aus der Borrelidin resistenten Mutante K12B Bor Res 3 waren identisch mit denen für das Enzym aus den Wildtypzellen K12B. Die Werte für das Enzym aus *E. coli* K12B Bor Res 2 waren jedoch niedriger, nämlich $1,5 \times 10^{-5} M$ Threonin und $5,2 \times 10^{-5} M$ ATP. Dieses unterschiedliche Verhalten der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 spiegelt sich auch in seiner Inhibitor-konstante für Borrelidin in Bezug auf Threonin wider: sie ist $7,5 \times 10^{-9} M$ Borrelidin, während sie $3,0 \times 10^{-9} M$ Borrelidin für das Enzym aus *E. coli* K12B, A 19 und K12B Bor Res 3 ist: In allen Fällen handelt es sich um eine nichtkompetitive Hemmung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Borrelidin in Bezug auf Threonin. Die Bestimmung des K_m -Wertes für Threonin der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt aus *E. coli* K12B Bor Res 2 ergab einen noch dreifach geringeren Wert als für das gereinigte Enzym dieser Zellen, nämlich $6 \times 10^{-6} M$.

Die veränderten Enzymkonstanten für die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 zeigen eine veränderte Struktur des Enzyms in dieser Mutante an. Auf eine unterschiedliche Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 weist auch der Befund, daß das Enzym dieser Mutante durch Dialyse gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung um 40 % inaktiviert wird, während diese Behandlung auf die Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt von *E. coli* A 19, K12B oder K12B Bor Res 3 keinen Einfluß hat.

Eine ausgeprägte Inaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 während seiner Isolierung wird auch angezeigt durch das Ergebnis, daß zur Neutralisation einer gegebenen Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität in der gereinigten Enzymfraktion ungefähr viermal soviel Anti-Threonyl-tRNA-synthetase-Serum benötigt wird, wie für die Neutralisation der gleichen Enzymaktivität im Rohextrakt dieser Mutante. In den gereinigten Enzymfraktionen aus *E. coli* A 19, K12B und K12B Bor Res 3 ist dagegen kein inaktives Enzymprotein nachzuweisen: zur Neutralisation einer bestimmten Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität wird die gleiche Menge Antiserum benötigt, egal ob das Enzym im Rohextrakt oder in der gereinigten Enzymfraktion enthalten ist.

Die identischen Neutralisationskurven der Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität im Rohextrakt von *E. coli* A 19, K12B und K12B Bor Res 3 stimmen mit der Annahme einer gleichen Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase in diesen *E. coli*-stämmen überein. Für die Neutralisation der gleichen Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität im Rohextrakt aus *E. coli* K12B Bor Res 2 wird jedoch viermal soviel Antiserum benötigt; wiederum ein Hinweis auf die veränderte Struktur des Enzyms in dieser Borrelidin resistenten Mutante.

Die Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt der vier untersuchten *E. coli* K12-stämme wird durch entsprechende Mengen Antiserum vollständig neutralisiert, obwohl das Antiserum gegen die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase hergestellt worden war. Dieser Befund und die Tatsache, daß während der Reinigung der Threonyl-tRNA-synthetase stets nur ein Enzymgipfel beobachtet wurde, zeigen an, daß in den

Zellen jeweils nur eine Threonyl-tRNA-synthetase vorhanden ist. Entsprechende Ergebnisse wurden auch für die Phenylalanyl-tRNA-synthetase (Fangman et al. 1965), die Tyrosyl-tRNA-synthetase (Calendar u. Berg 1966) und die Seryl-tRNA-synthetase (Katze u. Königsberg 1970) aus *E. coli* und die Histidyl-tRNA-synthetase (DeLorenzo u. Ames 1970) aus *Salmonella typhimurium* berichtet.

Die Versuche zur Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase aus den vier untersuchten *E. coli* K12-stämmen lassen keine Schlüsse zu auf eine gleiche oder unterschiedliche Struktur der Threonyl-tRNA-synthetase in diesen Zellen. Allen Threonyl-tRNA-synthetasen gemeinsam war eine relativ hohe Labilisierungstemperatur von 60°C. Für die 50 %-ige Inaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktion aus *E. coli* A 19, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 war eine Inkubation von 9 Minuten bei 60°C notwendig; für die Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Enzymfraktion aus *E. coli* K12B wurden unter gleichen Bedingungen 5 Minuten bis zur 50 %-igen Hitzeinaktivierung benötigt. Die größere Hitzeempfindlichkeit der Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Threonyl-tRNA-synthetase-Fraktion aus *E. coli* K12B könnte auf die größere Reinheit dieses Enzyms zurückzuführen sein; es ist 90-fach angereichert, im Gegensatz zu der nur ungefähr vierzigfachen Anreicherung des Enzyms in den gereinigten Threonyl-tRNA-synthetasefraktionen aus *E. coli* A 19 und K12B Bor Res 3. Eine Stabilisierung der Enzymaktivität von Aminoacyl-tRNA-synthetasen durch Fremdproteine zum Beispiel Albumin, ist wiederholt beschrieben worden (Hirsh, 1968; Yaniv u. Gros 1969; DeLorenzo u. Ames 1970; Ostrem u. Berg 1970). Für eine Stabilisierung der Threonyl-tRNA-synthetase durch Fremdproteine spricht auch der Befund, daß zur 50 %-igen Inaktivierung des Enzyms im Rohextrakt von *E. coli* K12B und A 19 in gleicher Weise 12 Minuten bei 60°C benötigt werden. Außerdem weist die anfängliche Abflachung der Neutralisationskurve für die Threonyl-tRNA-synthetase in der gereinigten Enzymfraktion aus *E. coli* K12B darauf hin, daß die Fremdproteine eine bestimmte Mindestkonzentration haben müssen, um diese Schutzfunktion auszuüben.

Die Hitzeinaktivierung von Aminoacyl-tRNA-synthetasen kann durch die Anwesenheit von Substraten beeinflusst werden: so verzögert die zugehörige tRNA die Hitzeinaktivierung der Arginyl-tRNA-

synthetase und der Glutamyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* B (Mitra et al. 1970) und der Arginyl-tRNA-synthetase aus Hefe (Chlumecka et al. 1970). Für die Lysyl-tRNA-synthetase aus Hefe werden unterschiedliche Ergebnisse berichtet (Chlumecka et al. 1970; Berry u. Grunberg-Manago, 1970). Die tRNA hat keinen Einfluß auf die Hitzeinaktivierung der Seryl-tRNA-synthetase aus Hefe (Makman u. Cantoni, 1966) und auf die Glycyl-tRNA-synthetase aus Rattenleber (Kukhanova et al. 1968) und auf die Valyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12 (Yaniv u. Gros 1969) und aus Rinderleber (Frolova u. Kisselev, 1971). Eine Steigerung der Hitzeempfindlichkeit durch homologe tRNA wird für die Lysyl-tRNA-synthetase (Ikegami u. Griffin 1969) aus Rattenleber berichtet. Außerdem wird die Valyl-tRNA-synthetase aus Rinderleber durch Hefe-tRNA hitzeempfindlicher. (Frolova u. Kisselev 1971), wogegen Coli-tRNA die Arginyl-tRNA-synthetase aus Rattenleber hitzestabiler macht (Ikegami u. Griffin 1969).

Die Hitzeempfindlichkeit der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B, A 19, K12B Bor Res 2 und K12B Bor Res 3 wurde in allen Fällen durch die Anwesenheit von *E. coli* K12 oder *E. coli* B tRNA gesteigert; dies zeigt eine Konformationsänderung der Threonyl-tRNA-synthetase durch die tRNA an. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Allende et al. (1970) von einer Labilisierung des Komplexes aus Rattenleber-Threonyl-tRNA-synthetase und ATP durch die homologe tRNA berichten.

Die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 besitzt also veränderte Enzymkonstanten, wie K_m -Werte für Threonin und ATP und Inhibitorkonstante für Borrelidin; außerdem zeigt sie eine andere Reaktion mit dem Antiserum als das Enzym aus den Wildtypzellen. Daraus ist zu schließen, daß die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 eine veränderte Struktur hat, die eine Resistenz dieser Mutante gegen Borrelidin bewirkt. Die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 3 stimmt in allen untersuchten Enzymkonstanten sowie seiner Reaktion mit dem Antiserum mit dem Enzym aus *E. coli* K12B und A 19 überein. Daraus ergibt sich der Schluß, daß die vierfach höhere spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt dieser Borrelidin resistenten Mutante die vierfache Menge an Threonyl-tRNA-synthetase

in diesen Zellen widerspiegelt und daß dies eine Borrelidin Resistenz bedingt. In einer E. coli K12 -Mutante wurde kürzlich die dreifache Menge an Wildtyp-Methionyl-tRNA-synthetase entdeckt, ohne daß hierfür ein Selektionsfaktor bekannt ist (Cassio et al. 1970; Cassio u. Waller 1971). Die weitere genetische und biochemische Analyse der Borrelidin resistenten Mutante E. coli K12B Bor Res 3 kann Auskunft darüber geben, auf welche Weise der erhöhte Spiegel an Threonyl-tRNA-synthetase in diesen Zellen zustande kommt.

5. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob Borrelidin resistente *E. coli* Mutanten mit veränderter Threonyl-tRNA-synthetase Aktivität in Struktur- und Regulationsmutanten einzuteilen sind.

Hierfür wurde die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B und A 19, sowie den beiden Borrelidin resistenten Mutanten von *E. coli* K12B maximal hundertfach angereichert. Gegen die Wildtyp-Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A 19 wurden Antikörper hergestellt, die die Aktivität des Enzyms aus allen untersuchten *E. coli*-stämmen selektiv neutralisierten.

Während der Anreicherungen der Threonyl-tRNA-synthetase wurde stets nur ein Enzymgipfel beobachtet. Außerdem neutralisierte das Antiserum, welches gegen die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* A 19 hergestellt worden war, auch die Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität in den Rohextrakten der vier *E. coli* K12-stämme vollständig. Aus diesen beiden Befunden ist zu schließen, daß in den Zellen jeweils nur eine Threonyl-tRNA-synthetase vorhanden ist.

Die K_m -Werte waren mit $8 \times 10^{-5} M$ für Threonin und $1 \times 10^{-4} M$ für ATP identisch für die gereinigte Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B, A 19 und der Borrelidin resistenten Mutante K12B Bor Res 3. Dagegen waren die entsprechenden Werte für die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2 mit $1,7 \times 10^{-5} M$ Threonin und $5 \times 10^{-5} M$ ATP erniedrigt.

Die Threonyl-tRNA-synthetase wurde in allen Fällen nichtkompetitiv in Bezug auf Threonin durch Borrelidin gehemmt; die Inhibitorkonstante war $3,0 \times 10^{-9} M$ Borrelidin für die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B, A 19 und K12B Bor Res 3, jedoch $7,5 \times 10^{-9} M$ Borrelidin für das Enzym aus *E. coli* K12B Bor Res 2.

Um eine deutliche Hitzeinaktivierung der Threonyl-tRNA-synthetase zu erreichen, war eine relativ hohe Temperatur von $60^\circ C$ notwendig. In Anwesenheit von tRNA wurde die Threonyl-tRNA-synthetase aus allen vier *E. coli* K12-stämmen hitzelabiler, was auf eine Konformationsänderung des Enzyms durch die tRNA hinweist.

Die Threonyl-tRNA-synthetase Aktivität im Rohextrakt aus *E. coli* A 19, K12B und K12B Bor Res 3 wurde in gleicher Weise durch das Antiserum neutralisiert; die dreifache Menge an Antiserum war jedoch notwendig, um die gleiche Threonyl-tRNA-synthetaseaktivität im Rohextrakt aus *E. coli* K12B Bor Res 2 zu neutralisieren.

Aus den veränderten Enzymkonstanten der Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 2, der unterschiedlichen Reaktion dieses Enzyms mit dem Antiserum sowie seiner Empfindlichkeit gegen konzentriertes Ammoniumsulfat wird geschlossen, daß das Enzym in dieser Borrelidin resistenten Mutante im Vergleich zu der Threonyl-tRNA-synthetase aus dem Wildtyp eine veränderte Struktur besitzt. Da sich die Threonyl-tRNA-synthetase aus *E. coli* K12B Bor Res 3 in allen untersuchten Eigenschaften und Enzymkonstanten wie das Wildtypenzym verhält, ist zu folgern, daß die vierfach höhere spezifische Aktivität der Threonyl-tRNA-synthetase im Rohextrakt aus *E. coli* K12B Bor Res 3 die vierfache Menge des Enzyms in diesen Zellen widerspiegelt. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß eine Borrelidin Resistenz in *E. coli* K12B Bor Res 2 erreicht wird durch die veränderte Struktur ihrer Threonyl-tRNA-synthetase und in *E. coli* K12B Bor Res 3 durch Bildung der vierfachen Menge des Enzyms.

LITERATUR

- Alexander, R.R., Calvo, J.M., Freundlich, M.: J. Bact. 106, 213 (1971)
- Allende, C.C., Allende, J.E., Gatica, M., Celis, J., Mora, G., Matamala, M.: J. Biol. Chem. 241, 2245 (1966)
- Allende, C.C., Chaimovich, H., Gatica, M., Allende, J.E.: J. Biol. Chem. 245, 93 (1970)
- Arndt, D.J., Berg, P.: J. Biol. Chem. 245, 665 (1970)
- Baldwin, A.N., Berg, P.: J. Biol. Chem. 241, 839 (1966)
- Bennet, Th. P.: Nature 214, 1131 (1967)
- Benzer, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 344 (1955)
- Berg, P., Bergmann, F.H., Ofengand, E.J., Dieckman, M.: J. Biol. Chem. 236, 1726 (1961)
- Berger, J., Jampolsky, L.M., Goldberg, M.W.: Arch. Biochem. Biophys. 22, 476 (1949)
- Berry, S.A., Grunberg-Manago, M.: Biochem. Biophys. Acta 217, 83 (1970)
- Bumstedt, R.M., Dahl, J.C., Söll, D., Strominger, J.C.: J. Biol. Chem. 243, 779 (1968)
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K.F.: Nature 221 43 (1969)
- Calendar, D., Berg, P.: Biochemistry 5, 1690 (1966)
- Cassio, D., Lawrence, F., Lawrence, D.: Europ. J. Biochemistry 15, 331 (1970)
- Cassio, D., Waller, J.P.: Europ. J. Biochem. 20, 283 (1971)
- Cassio, D., Waller, J.P.: FEBS Letters 12, 309 (1971)
- Ceccarini, C., Maggio, R.: Biochem. Biophys. Acta 190, 556 (1969)
- Chapeville, F., Lipmann, F., v. Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray, W.Y., Benzer, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1086 (1962)
- Chlumecka, V., Mitra, S.K., D'Obrenan, P., Smith, Ch.J.: J. biol. Chem. 245, 2241 (1970)
- Cinader, B.: Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 761 (1955)
- Cramer, F., Erdmann, V.A., v.d.Haar, F., Schlimme, E.: J. Cell. Physiol. 74, Sup. 1, 163 (1969)
- DeLorenzo, F., Ames, B.N.: J. Biol. Chem. 245, 1710 (1970)

- Dixon, M.: Biochem. J. 55, 170 (1953)
- Dixon, M., Webb, E.C.: "Enzymes", Longmans, London (1964)
- Ehrenstein, G.V.: in "Aspects of Protein Biosynthesis", Anfinsen, Seite 139 C.B. (Editor), Acad. Press (1970)
- Eidlic, L., Neidhardt, F.C.: Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 539 (1965)
- Fangman, W.L., Neidhardt, F.C.: J. Biol. Chem. 239, 1839 (1964)
- Fangman, W.L., Nass, G., Neidhardt, F.C.: J. Mol. Biol. 13, 202 (1965)
- Favorova, O., Kisselev, L.: personal communication (1971)
- Gesteland, R.F.: J. Mol. Biol. 16, 67 (1966)
- Gould, R.M., Thornton, M.P., Liepkalns, V., Lennarz, W.J.: J. Biol. Chem. 243, 3096 (1968)
- Fraenkel, D., Neidhardt, F.C.: Biochim. Biophys. Acta 53, 96 (1961)
- Hayash, H., Knowles, J.R., Katze J., Lapointe, J., Söll, D.: J. Biol. Chem. 245, 1401 (1970)
- Hirsh, D.J.: J. Biol. Chem. 243, 5731 (1968)
- Hirshfield, J.N., Bloemers, J.P.J.: J. Biol. Chem. 244, 2911 (1969)
- Hoch, S.O., Roth, C.W., Crawford, J.P., Nester, E.W.: J. Bact. 105, 38 (1971)
- Hoffmann, E.P., Wilhelm, R.C., Konigsberg, W., Katze, J.R.: J. Mol. Biol. 47, 619 (1970)
- Hütter, R., Poralla, K., Zachau, H.G., Zährner, H.: Biochem. Z. 344, 190 (1966)
- Ikegami, H., Griffilin, A.C.: Biochim. Biophys. Acta 186, 217 (1969)
- Jacobson, K.B.: Cold Spring Harbor Symp. 31, 719 (1966)
- Jatica, M., Allende, C.C.: Biochim. Biophys. Acta 129, 201 (1966)
- Kano, Y., Matsushiro, A., Shimura, J.: Molec. Gen. Genetics 102, 15 (1968)
- Katze, J.R., Konigsberg, W.: J. Biol. Chem. 245, 923 (1970)
- Keller-Schierlein, W.: Helv. Chim. Acta 50, 731 (1967)
- Kondo, M., Woese, C.R.: Biochemistry 8, 4177 (1969)
- Küntzel, H.: Current Topics in Microbiology and Immunology 54, 94 (1971)

- Kukhanova, M.K., Favorova, O., Kisselev, L.L.: Biokhimiya 33, 493 (1968)
- Lineweaver, H., Burk, D.: J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- Loftfield, R.B., Eigner, E.A.: Biochemistry 7, 1100 (1968)
- Loftfield, R.B., Eigner, E.A.: Biochem. Biophys. Acta 130, 426 (1966)
- Loftfield, R.B., Eigner, E.A.: Biochem. Biophys. Acta 72, 383 (1963)
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- Makman, M.H., Cantoni, G.L.: Biochemistry 5, 2246 (1966)
- McLaughlin, C.S., Magee, P.T., Hartwell, L.H.: J. Bact. 100, 579 (1969)
- Mehler, A., Jescusky, H.: in Proc. Nucl. Acid Res., p. 420 (1966)
Ed. Cantoni u. Davies, Harper and Row
- Mitra, S.K., Chakraborty, K., Mehler, A.H.: J. Mol. Biol. 49, 139 (1970)
- Mostella, R.D., Yanofsky, Ch.: J. Bact. 105, 268 (1971)
- Muench, K.M., Berg, P.: in Cantoni, G.L. and Davies, D.R. (Editors),
"Proc. in Nucleic Acid Res.", p. 375, Harper and Row
(1966)
- Nass, G.: Molec. Gen. Genetics 100, 216 (1967)
- Nass, G.: Zbl. Bakteriologie. I. Orig. 212, 239 (1969)
- Nass, G., Hasenbank, R.: Molec. Gen. Genetics 108, 28 (1970)
- Nass, G., Neidhardt, F.C.: Bact. Proc. 87 (1966)
- Nass, G., Neidhardt, F.C.: Biochem. Biophys. Acta 134, 347 (1967)
- Nass, G., Poralla, K., Zähler, H.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 84 (1969)
- Nass, G., Poralla, K., Zähler, H.: Naturwiss., 1971, i Druck
- Neidhardt, F.C.: J. Cell. Physiol. 74, Sup. 1, 87 (1969)
- Nirenberg, M.: in "Aspects of Protein Biosynthesis", Anfinsen, C.B. (Editor), Acad. Press, 1970
- Novelli, G.D.: Ann. Rev. Biochem. 36, 449 (1967)
- Ostrem, D.L., Berg, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1967 (1970)
- Peterson, E.A. in T.S. Work and E. Work (Editors) "Lab. Techniques in Biochem. and Molec. Biology", Part II, North-Holland Publ. Comp. (1970)
- Pollock, M.R.: J. Gen. Microbiol. 14, 90 (1956)

- Poralla, K.: Dissertation, Tübingen (1967)
- Poralla, K., Zähler, H.: Arch. Mikrobiol. 61, 143 (1968)
- Reger, B.J., Fairfield, S.A., Epler, J.C., Barnett, W.E.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1207 (1970)
- Rennert, O.M.: Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 878 (1969)
- Roth, J.R., Ames, B.N.: J. Mol. Biol. 22, 325 (1966)
- Rouget, P., Chapeville, F.: Europ. J. Biochem. 4, 310 (1968)
- Rouget, P., Chapeville, F.: Europ. J. Biochem. 14, 498 (1970)
- Schlesinger, S., Magasanik, B.: J. Mol. Biol. 9, 670 (1964)
- Seifert, W., Quasba, P., Walter, G., Palm, P., Schachner, M.,
Zillig, W.: European J. Biochem. 9, 319 (1969)
- Steinberg, W., Anagnostopoulos, C.: J. Bact. 105, 6 (1971)
- Strominger, J.C.: 20. Colloq. Gesellsch. Biol. Chem., Seite 187, Springer
Verlag, Heidelberg (1969)
- Stulberg, P.: J. Biol. Chem. 242, 1060 (1967)
- Suskind, S.R.: J. Bact. 74, 308 (1957)
- Szentirmair, A., Szentirmair, M., Umbarger, H.E.: J. Bact. 95, 1672 (1968)
- Travers, A.A.: Nature 225, 1009 (1970)
- Waldenström, J.: Europ. J. Biochem. 3, 483 (1968)
- Williams, L.S., Neidhardt, F.C.: J. Mol. Biol. 43, 529 (1969)
- Yaniv, M., Gros, F.: in D. Shugar (Editor), "Genetic Elements",
Acad. Press, 157 (1967)
- Yaniv, M., Gros, F.: J. Mol. Biol. 44, 1 (1969)
- Zachau, H.G.: Angewandte Chemie 81, 645 (1969)

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
AS	Aminosäure
Bor Res	Borrelidin resistent
DEAE-	Diaethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
M	molar
mRNA	Messenger RNA
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s. (vor Zitaten)	Übersichtsarbeit
Std.	Stunde
tRNA	Transfer-RNA

Lebenslauf

- Am 2.7.1941. wurde ich, Wilfried Paetz, Sohn des Richard Paetz und dessen Ehefrau Margarete, geb. Müller, in Magdeburg geboren.
- 1948-1955 Besuch der Volksschule in Egel, Kreis Staßfurt.
- Februar 1963 Reifeprüfung am Gymnasium Scharnhorstschule in Hildesheim,
- Sommersemester 1964 Beginn des Studiums der Biologie an der Freien Universität Berlin,
- Mai 1967 Vordiplom im Fach Biologie an der Freien Universität Berlin,
- Juni 1969 Beginn der Ausführung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Frau Dr. G. Nass am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem,
- Oktober 1969 Fortsetzung der Dissertation unter Anleitung von Frau Dr. G. Nass am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Biologie, in Göttingen

Für die Überlassung des Themas und die stete und geduldige Förderung der vorliegenden Arbeit danke ich Frau Dr. G. Nass.

